

Untersuchungen zur Dimerisierung der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jan Robert Krähling
aus Dorsten

1. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Sönke Behrends
2. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
eingereicht am:	14.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	24.02.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Kraehling, J. R., Busker, M., Haase, T., Haase, N., Koglin, M., Linnenbaum, M., and Behrends, S. The amino-terminus of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase α_1 does not affect dimerization but influences subcellular localization. *PLoS ONE*, 2011. 6(9): e25772.

Haase, N., Haase, T., **Kraehling, J. R.**, and Behrends, S., Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive Guanylyl-Cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol*, 2010. 80, p. 1676-1683.

Haase, T., Haase, N., **Kraehling, J. R.**, and Behrends, S., Fluorescent Fusion Proteins of Soluble Guanylyl Cyclase Indicate Proximity of the Heme Nitric Oxide Domain and Catalytic Domain. *PLoS ONE*, 2010. 5(7): p. e11617.

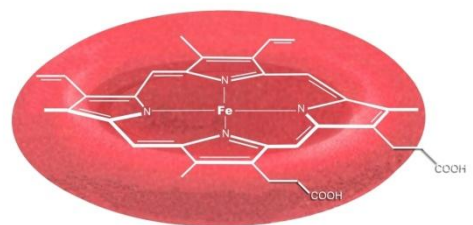


Meinen Eltern gewidmet



Groß sind die Werke des HERRN;
wer sie erforscht,
der hat Freude daran.

Psalm 111, 2



Häm
(Hermann Roth)



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Cyclisches Guanosinmonophosphat als Signalmediator	3
1.2 Stickstoffmonoxid	5
1.3 Modulatoren der NOsGC	8
1.3.1 NOsGC-Stimulatoren	10
1.3.2 NOsGC-Aktivatoren	11
1.3.3 Der NOsGC-Inhibitor ODQ.....	14
1.4 Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylyl-Cyclase.....	15
2. Zielsetzung und Fragestellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Chemikalien und Zellkulturreagenzien	23
3.1.2 Stammlösungen	26
3.1.3 Lösungen, Puffer, Medien und Marker	26
3.1.4 DNA und Vektoren	30
3.1.5 Enzyme und Reagenziensysteme.....	30
3.1.6 Antikörper.....	32
3.1.7 Zellen	33
3.1.8 Gewebe.....	33
3.1.9 Oligonukleotide	34
3.1.10 Hilfsmittel und Geräte.....	36
3.1.11 Software	40
3.2 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und deren Transformation.....	41
3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Kulturen	42
3.2.3 Untersuchung isolierter Plasmid-DNA.....	43
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.5 Konstruktion der verwendeten Plasmid-DNA.....	44
3.2.6 Mutationen bestimmter Nukleotide in Plasmid-DNA.....	55
3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur	57
3.3.1 Proteinexpression im Sf9/Baculovirus-Expressionssystem.....	57
3.3.2 Proteinexpression in HEK-293 Zellen	64
3.3.3 Proteinexpression in <i>E. coli</i> des Stamms BL21(DE3)pLysS	65
3.3.4 Proteinexpression in zellfreien <i>in vitro</i> Systemen.....	67
3.3.5 Gewinnung der rekombinant exprimierten Proteine	67
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	68
3.5 Immunpräzipitation	68

3.6	Anreinigung rekombinanter Proteine	70
3.6.1	Affinitätschromatographie mittels <i>Strep</i> -Tactin Ein-Schritt-Reinigung	70
3.6.2	Affinitätschromatographie mittels Anti-HA Affinity Matrix	71
3.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	72
3.7.1	Coomassie-Färbung	73
3.7.2	Silberfärbung	73
3.7.3	Western-Blot-Analyse	74
3.8	Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität	75
3.9	Bestimmung der Größe von Proteinen mittels Gelfiltration	78
3.10	Fluoreszenz-Mikroskopie	79
3.11	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	79
3.12	Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit mittels <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>	80
3.13	Statistische Auswertung	84
4.	Ergebnisse	85
4.1	Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens einer Spleißvariante der α_1 -Untereinheit der NOsGC	85
4.1.1	Identifizierung der durch das C- α_1 - und C*- α_1 -Transkript gebildete α_1 -Form der NOsGC	85
4.1.2	Vergleich der Expressionen der humanen $\alpha_1\Delta N_{236}$ - und der C- α_1 -Untereinheit	88
4.1.3	Etablierung einer neuen Ein-Schritt-Anreinigung der NOsGC	90
4.1.4	Untersuchung der Dimerisierungsfähigkeit des C- α_1 -Proteins mit Hilfe der Anreinigung über die β_1 -Untereinheit	93
4.1.5	FLIM-FRET-Untersuchungen zur Dimerisierung	99
4.1.6	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von C- α_1	100
4.1.7	Analyse des Redox-Status von α_1 Wildtyp und C- α_1	103
4.2	Weitergehende Untersuchungen zur Dimerisierung der NOsGC-Untereinheiten	106
4.2.1	Einfluss einer weitergehenden aminoterminalen Trunktion der α_1 -Untereinheit ($\alpha_1\Delta N_{364}$)	106
4.2.2	Einfluss einer analogen Deletion der H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit auf die Dimerisierung	107
4.2.3	Untersuchung eines möglichen Austauschs zwischen Untereinheiten der NOsGC-Dimere	109
4.3	Untersuchungen der Dimerisierung der NOsGC-Untereinheiten in einem prokaryotischen System oder in zellfreien Expressionssystemen	111
4.3.1	Untersuchung der Dimerisierung in <i>E. coli</i>	112

4.3.2	Untersuchung der Dimerisierung in zellfreien Expressionsystemen	113
4.3.3	Identifizierung etwaiger Supplemente für die zellfreie Expression	116
5.	Diskussion	121
5.1	Entwicklung einer neuen Ein-Schritt-Anreinigung für die NOsGC	121
5.2	Untersuchungen zu C- α_1	124
5.3	Weitergehende Untersuchungen zur Dimerisierung der NOsGC	128
5.4	Expression der NOsGC in prokaryotischen und zellfreien Systemen ...	130
6.	Zusammenfassung.....	134
7.	Anhang.....	136
7.1	Sequenz der codonoptimierten Variante von β_1 -S (rat)	136
7.2	Sequenzalignement zwischen den α_1 -Untereinheiten von <i>Homo sapiens</i> und <i>Rattus norvegicus</i>	137
7.3	Übersicht über die Homologien der Aminosäuresequenzen von <i>Homo sapiens</i> und <i>Rattus norvegicus</i>	138
8.	Quellenverzeichnis.....	139
9.	Abbildungsverzeichnis	157
10.	Abkürzungsverzeichnis	159

X



1. Einleitung

„Es klingt wie ein Scherz, den das Schicksal mir macht, daß man mir Nitroglycerin zum Einnehmen verordnet. Sie nennen es Trinitrin, aber doch wohl nur, um die Apotheker und die Patienten nicht zu erschrecken.“
(zitiert nach REMANE AND REMANE, 2010)

Diese Worte stammen von *Alfred Nobel* (1896), dem Erfinder des Dynamits, einem auf der Basis von Glyceroltrinitrat wirkenden Sprengstoff. Drei Jahrzehnte zuvor war der Einsatz eines organischen Nitrats zur Therapie der *Angina pectoris* erstmals beschrieben worden (LAUDER BRUNTON, 1867). *Lauder Brunton* war unzufrieden mit den wenig erfolgreichen Therapien der *Angina pectoris* zur damaligen Zeit. Die Patienten wurden mit Weinbrand, Ether, Chloroform und Ammoniak behandelt, wobei diese Maßnahmen die Beschwerden nur wenig linderten. *Lauder Brunton* wusste einerseits, dass Patienten durch kontrollierten Blutverlust, dem sogenannten Aderlass, zumindest kurzfristig erfolgreich zu behandeln waren. Andererseits war ihm bekannt, dass Amylnitrit zu Gesichtsrötung, Herzklopfen und Erweiterungen der Arterien führt. Dieses Wissen, ließ ihn vermuten, dass Amylnitrit den Effekt des Aderlasses, die Reduktion des arteriellen Drucks, nicht-invasiv nachahmen könnte. Ein von ihm durchgeführter Therapieversuch bestätigte die Wirksamkeit von Amylnitrit zur Therapie der *Angina pectoris* (LAUDER BRUNTON, 1867). *Murell* beschrieb wenige Jahre später die Wirksamkeit von Glyceroltrinitrat (MURRELL, 1879). Der molekulare Wirkungsmechanismus der organischen Nitrate konnte allerdings erst ein Jahrhundert später aufgeklärt werden.

Nachdem *Rall* und *Sutherland* Ende der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) entdeckt hatten (RALL AND SUTHERLAND, 1958), wurde 1963 erstmals ein ähnliches Nukleotid, das cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP) beschrieben (ASHMAN ET AL., 1963). Die Suche nach den Enzymen, welche für die Bildung des sekundären Botenstoffs cGMP verantwortlich sind, führte wenige Jahre später zur Entdeckung der Guanylyl-Cyclasen (BÖHME ET AL., 1969; HARDMAN AND SUTHERLAND, 1969; SCHULTZ ET AL., 1969; WHITE AND AURBACH, 1969; vgl. Abbildung 1). Wenige Jahre später wurde von der Arbeitsgruppe um *Ferid Murad* beschrieben, dass zwei verschiedene Isoformen der Guanylyl-Cyclase existieren,

eine cytosolische (NOsGC; nitric oxide sensitive guanylyl cyclase) und eine membrangebundene (pGC; p für partikulär) (KIMURA AND MURAD, 1974a; KIMURA AND MURAD, 1975). Bis zu diesem Zeitpunkt waren noch keine endogenen Modulatoren der Enzymaktivität der Guanylyl-Cyclase entdeckt worden. Allerdings konnte bereits 1977 gezeigt werden, dass aus Glyceroltrinitrat gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) die Guanylyl-Cyclase zu aktivieren vermochte (ARNOLD ET AL., 1977; KATSUKI ET AL., 1977; MIKI ET AL., 1977; SCHULTZ AND SCHULTZ, 1977). Das Ergebnis wurde jedoch für physiologisch irrelevant erachtet, da man zu jener Zeit noch keine endogene Synthese von NO vermutete. Etwa zur gleichen Zeit forschte *Robert Furchgott* an der Relaxation von Blutgefäßen und untersuchte dabei auch den Neurotransmitter Acetylcholin als Vasodilatator. Bei den von *Furchgott* selbst ausgeführten Experimenten mit Acetylcholin sah er eine Vasokonstriktion, bei den von seinem Assistenten *John Zawadzki* (FURCHGOTT, 1996) durchgeführten Versuchen zeigte sich dagegen eine Vasorelaxation. Der Unterschied in den experimentellen Details bestand darin, dass *Furchgott* die Blutgefäße zuvor reinigte, und damit unabsichtlich von der *Tunica intima* und der *Tunica adventia* befreite, wohingegen *Zawadzki* die Gefäße unverändert im Experiment verwendete (SNYDER, 2005). Auf der Grundlage dieser überraschenden Diskrepanz schlussfolgerte *Furchgott*, dass das Endothel unter der Einwirkung von Acetylcholin einen Vasodilatator, den »endothelium derived relaxing factor« (EDRF) freisetze. Durch ein „Sandwich-Experiment“ (FURCHGOTT, 1996), bei dem er zuvor entferntes Endothel wieder auf die gereinigten Gefäße legte, konnte er die Vasorelaxation durch Acetylcholin wieder herstellen.

In den darauffolgenden Jahren wurde versucht EDRF zu identifizieren. Im Jahr 1987 gelang der entscheidende Nachweis, dass es sich bei EDRF um NO handelt (IGNARRO ET AL., 1987; PALMER ET AL., 1987): Es zeigte sich, dass die Halbwertszeiten von EDRF und NO nahezu identisch waren und die vasorelaxierende Wirkung beider Mediatoren durch dieselben Moleküle (z.B. Oxyhämoglobin) aufgehoben wurde. *Furchgott*, *Murad* und *Ignarro* bekamen 1998 den Nobelpreis für Medizin für ihre Forschung zuerkannt.

Mit der Entdeckung der ersten Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) konnte die NO/NOsGC/cGMP-Signaltransduktionskaskade vervollständigt werden (PALMER AND

Einleitung

MONCADA, 1989). Es wurden drei verschiedene Isoformen der NOS identifiziert. (1) Die konstitutiv aktive endotheliale NOS (eNOS oder NOS-3), welche an der Vasorelaxation beteiligt ist, (2) die ebenfalls konstitutiv aktive neuronale NOS (nNOS oder NOS-2), welche die Neurotransmission zu modulieren vermag und (3) die induzierbare NOS (iNOS oder NOS-1), welche bei der Immunabwehr von Bedeutung ist (LEIPER AND NANDI, 2011). Neben diesen drei „klassischen“ NOS-Isoformen existiert noch eine mitochondriale NOS (mtNOS; Spleißvariante der nNOS) der eine modulierende Funktion auf den mitochondrialen Stoffwechsel zugeschrieben wird (KANAI ET AL., 2001). Seit Jahren ist bekannt, dass die eNOS „entkoppelt“ werden kann (LIST ET AL., 1997) durch ein Übermaß an reaktiven Sauerstoffspezies, wie sie beispielsweise bei Hypercholesterolämie, Hypertension oder *Diabetes mellitus* auftreten können (FÖRSTERMANN, 2006). Der Cofaktor der eNOS, das Tetrahydrobiopterin (BH₄) wird durch die reaktive Sauerstoffspezies zum Dihydrobiopterin (BH₂) oxidiert. In der Folge verarmt die eNOS an BH₄, verliert damit die Fähigkeit der NO-Synthese und bildet stattdessen reaktive Sauerstoffspezies durch die NADPH-vermittelte Reduktion¹ von Sauerstoff.

1.1 Cyclisches Guanosinmonophosphat als Signalmediator

Das cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP) kann durch beide Isoformen der Guanylyl-Cyclasen, der NO-sensitiven (NOsGC) und der membranverankerten (pGC) gebildet werden (GARBERS, 1991; vgl. Abbildung 1).

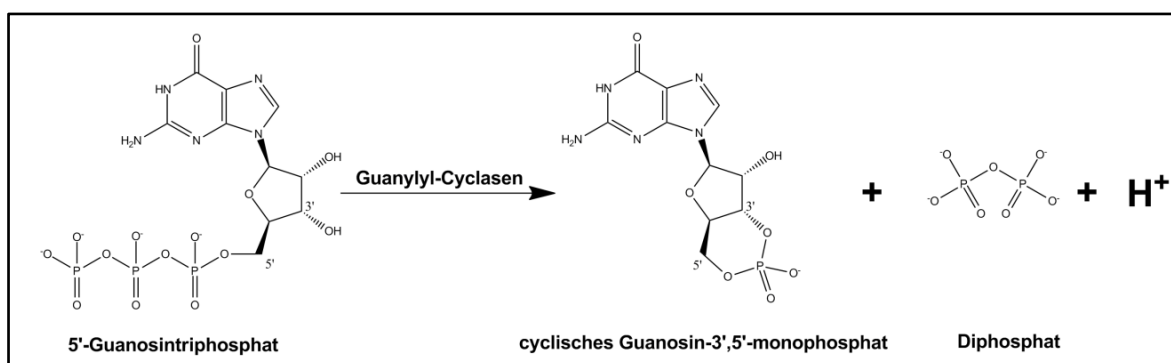


Abbildung 1

Reaktion, die durch die Guanylyl-Cyclasen katalysiert wird.

¹ Die eNOS oxidiert ein Stickstoffatom aus der Guanidinfunktion des L-Arginins, reduziert aber Sauerstoff für die Bildung von NO und L-Citrulin, weshalb man auch von einer „mischfunktionalen“ Oxygenase spricht (MÜLLER-ESTERL AND PLENIKOWSKI, 2009).

Die pGC gehört, ebenso wie der Insulinrezeptor, zur Klasse derjenigen Rezeptoren, die direkt mit einem Effektorenzym gekoppelt sind. Bisher sind fünf verschiedene Isoformen der pGC identifiziert worden (zur Übersicht: LUCAS ET AL., 2000). Ein Beispiel für eine partikuläre GC ist die die pGCA, welche durch die natriuretischen Peptide aktiviert wird. Eines dieser natriuretischen Peptide ist das atriale natriuretische Peptide (ANP), welches in den Vorhöfen des Herzens nach einem Dehnungsreiz freigesetzt wird und somit an der Regulation des Herz-Kreislauf-Systems beteiligt ist, indem es die Gefäße dilatiert und diuretisch wirkt.

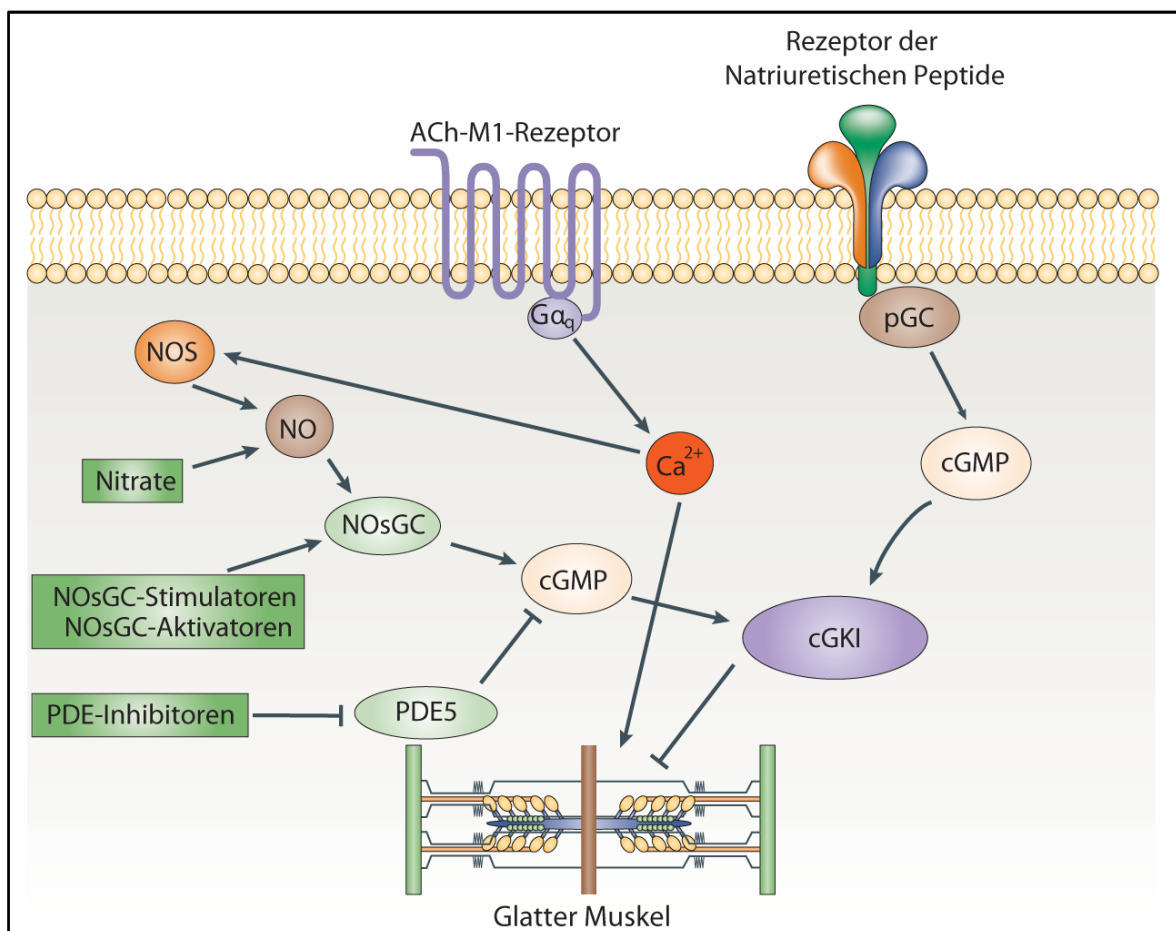


Abbildung 2

Die **cGMP-bildenden Enzyme** und die durch **cGMP-vermittelten Effekte** (modifiziert nach MCKINSEY AND KASS, 2007).

Das cGMP vermittelt seine Wirkungen über drei verschiedene Effektorsysteme, (1) cGMP-gesteuerte Kationenkanäle (BIEL AND MICHALAKIS, 2009), (2) cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs; HOFMANN ET AL., 2009) oder (3) cGMP-regulierte

Einleitung

Phosphodiesterasen (FRANCIS ET AL., 2009). Ein Beispiel für einen durch cGMP regulierten Ionenkanal stellt der an der Phototransduktion beteiligte Natriumionenkanal dar. Bei Lichteinfall auf die Retina sinkt über eine mehrschrittige Signalkette² der cGMP-Spiegel. Dies führt zu einem Verschließen des Natriumkanals, so dass die Zelle hyperpolarisiert und nachfolgend das Signal weitergeleitet wird. Die Phosphodiesterasen (PDE) sind an der Kontrolle der cAMP/cGMP-Spiegel beteiligt und können zum Teil selbst durch cyclische Nukleotide reguliert werden (OMORI AND KOTERA, 2007). Die Phosphodiesterasen sind Ziel von verschiedenen Pharmaka. Eine Hemmung der PDE5 (cGMP-spezifisch) wird zur Therapie der erektilen Dysfunktion (z.B. Sildenafil in Viagra®) oder zur Therapie der pulmonalen Hypertonie (z.B. Tadalafil in Adcirca®) genutzt. Zu den beiden beim Menschen beschriebenen cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehört die cGMP-Kinase I (cGKI), welche an der Vasodilatation der Gefäße beteiligt ist. Die cGKI phosphoryliert die Myosin-light-chain-kinase, wodurch dieses an der Vasokonstriktion beteiligte Enzym inhibiert wird (Abbildung 2). Die cGMP-Kinase II ist hingegen am Na⁺/Cl⁻-Transport im Darm und an der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beteiligt (RUTH, 1999).

1.2 Stickstoffmonoxid

Die Entdeckung der Gasotransmitter geht auf den Nachweis zurück, dass es sich beim EDRF um Stickstoffmonoxid handelt (IGNARRO ET AL., 1987; PALMER ET AL., 1987). Heute sind drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) bekannt, welche NO endogen bilden können. Durch die Bindung von NO kann die Aktivität der NOsGC um mehr als das Hundertfache ansteigen (zur Übersicht: DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009). Neben den durch cGMP vermittelten Effekten wie Vasodilatation, Modulation der Neurotransmission, Hemmung der Thrombocytenaggregation und peniler Erektion, gibt es auch cGMP-unabhängige Effekte von NO (BRYAN ET AL., 2009; MUSTAFA ET AL., 2009; GAO, 2010). So drosselt NO beispielsweise den Metabolismus, indem es mit der Elektronentransportkette der Mitochondrien

² Licht → 11-*cis*-Retinal im Opsin (zusammen: Rhodopsin) → all-*trans*-Retinal → Metarhodopsin → Aktivierung von Transducin (G_i) → Aktivierung einer cGMP-PDE (PDE-6) → cGMP ↓ → cGMP-gesteuerte Na⁺-Kanäle schließen sich → Hyperpolarisation → Signal (MÜLLER-ESTERL AND PLENIKOWSKI, 2009)

interagiert und somit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eindämmt (RASSAF ET AL., 2007). Dieser Effekt soll besonders in ischämischen Geweben relevant sein, wie sie beispielsweise nach einem Myokardinfarkt auftreten. Das NO wird hierbei aus Nitrit (NO_2^-) freigesetzt, welches durch Myoglobin (COSSINS AND BERENBRINK, 2008; LUNDBERG ET AL., 2009) oder Hämoglobin (GRUBINA ET AL., 2007) reduziert wird. Das Nitrit wird aus alimentärem Nitrat (NO_3^-) durch Bakterien des Zungengrundes gebildet (LUNDBERG ET AL., 2008). Da die Reduktion von NO_2^- zu NO bevorzugt bei einem niedrigen pH-Wert abläuft, besteht eine gewisse Selektivität dieser Reaktion in sauerstoffarmen Geweben. Unter normoxischen Bedingungen überwiegt die Oxidation von Nitrit zu Nitrat.

Die physiologische Konzentration von NO wird mit 0,1 bis 600 nM angegeben (KAJIMURA ET AL., 2010). Diese große Spannweite der Angabe liegt einerseits an der Tatsache, dass verschiedene Gewebe unterschiedlich hohe NO-Konzentrationen aufweisen. Andererseits ist die Messung von NO schwierig, da es nur eine kurze Halbwertszeit von etwa 200 ms besitzt (SIERVO ET AL., 2010). Für das Erreichen einer biologischen Antwort scheinen Konzentrationen von 0,1 – 5 nM auszureichen (HALL AND GARTHWAITE, 2009; FRITZ ET AL., 2011). NO vermag aufgrund seiner elektrischen Neutralität Membranen zu überwinden. Dies ist notwendig, damit im Endothel gebildetes NO die NOsGC in den glatten Muskelzellen der Gefäße überhaupt erreichen kann (vgl. Abbildung 7). Es konnte gezeigt werden, dass NO eine Distanz von etwa 200 μm überwinden kann (WOOD AND GARTHWAITE, 1994).

Therapeutisch findet NO-Gas Anwendung zur Therapie einer respiratorischen Insuffizienz von Frühgeborenen (INOMax[®]) und bewirkt eine pulmonale Vasodilatation (CLARK ET AL., 2000). Im Jahr 2010 wurden die Ergebnisse der EUNO-Studie (*early use of low-dose inhaled nitric oxide*) in *The Lancet* veröffentlicht (MERCIER ET AL., 2010). Diese zeigte keinen Vorteil dieser therapeutischen Intervention bezüglich der Mortalität oder dem Auftreten von neurologischen Schäden. Daher ist fraglich, ob NO für diese Indikation weiterhin Einsatz finden wird.

NO-freisetzende Pharmaka

Die klassische Indikation von NO-Donatoren ist bis heute die Behandlung von akuten *Angina pectoris*-Anfällen (MILLER AND MEGSON, 2007). Die therapeutisch eingesetzten Konzentrationen der NO-Donatoren reichen nur für die Dilatation der Venen und haben kaum Einfluss auf den Gefäßdurchmesser von Arterien, wodurch bei der Anwendung von organischen Nitraten vornehmlich die Vorlast gesenkt wird. Dies führt zu einem geringeren enddiastolischen Druck und einer damit verbundenen Verringerung der Wandspannung des Myokards, so dass dessen Perfusion verbessert wird. In Deutschland finden zurzeit fünf Substanzen therapeutische Anwendung. Neben dem Glyceroltrinitrat (z.B. Nitrolingual[®]) sind Isosorbiddinitrat (z.B. isoket[®]), Isosorbidmononitrat (z.B. Monoclar[®]), Pentaerythrityltetranitrat³ (Pentalong[®]) und Molsidomin (z.B. Corvaton[®]) verfügbar. Molsidomin stellt eine Ausnahme dar, da es nicht-enzymatisch, über den aktiven Metaboliten Linsidomin⁴ NO freizusetzen vermag. Bis heute ist nicht genau geklärt, wie die Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat und Pentaerythrityltetranitrat, also die Freisetzung von NO abläuft. Allerdings gibt es belastbare Hinweise dafür, dass die Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2) eine entscheidende Rolle spielt (CHEN ET AL., 2002; MACKENZIE ET AL., 2005; WENZL ET AL., 2011). Die Gabe von NO-Donatoren führt, besonders zu Beginn der Therapie, zu Kopfschmerzen („Nitratkopfschmerz“), da es zur unerwünschten Dilatation von Gefäßen in der schmerzempfindlichen *Dura mater* (harte Hirnhaut) kommt (BAGDY ET AL., 2010).

Schon lange ist bekannt, dass einige NO-Donatoren, besonders die lipophilen Alkylnitate (umgangssprachlich als »Poppers« bezeichnet), auch missbräuchlich angewendet werden können (PEARLMAN AND ADAMS, 1970). Durch eine kurzfristige Dilatation von Hirngefäßen soll ein Gefühl des Rausches entstehen. Trotz der bekannten Risiken, z.B. dem Auftreten eines akuten Glaukomanfalls oder Retinopathien, werden auch vier Jahrzehnte später noch Fallbeispiele in renommierten Journals beschrieben (VIGNAL-CLERMONT ET AL., 2010).

³ Pentaerythrityltetranitrat war das einzige Langzeitnitrat, welches eine Zulassung in der ehemaligen DDR besaß (SCHWABE AND PAFFRATH, 2006).

⁴ Linsidomin (SIN-1) reagiert mit OH⁻ zu SIN-1A, welches spontan in SIN-1C und NO zerfällt (LI AND FÖRSTERMANN, 2010).

Neben diesen primären NO-Donatoren, also Wirkstoffen, deren eigentliches therapeutisches Ziel die Aktivierung der NOsGC ist, gibt es NO-freisetzende Arzneistoffe, deren eigentliches Target nicht die NOsGC ist. So ist seit 1997 der selektive β_1 -Adrenorezeptorantagonist („ β -Blocker“) Nebivolol (z.B. Nebilet®) im Handel, der indirekt NO freisetzt (IGNARRO ET AL., 2002; MAFFEI ET AL., 2007) und so die Wirkqualität eines reinen β_1 -Antagonismus um eine aktive Vasodilatation erweitert.

Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte NO-Donator war DEA/NO (Abbildung 3). Hierbei handelt es sich um Diethylamin-Addukt mit zwei Molekülen NO.

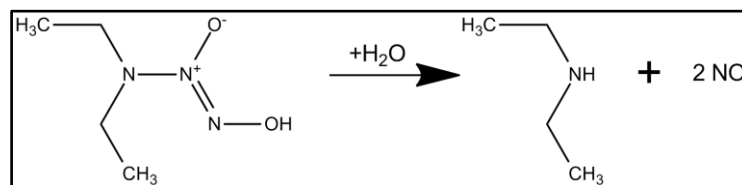


Abbildung 3

Strukturformel von DEA/NO und Zersetzung in Gegenwart von Wasser mit der einhergehenden Freisetzung von zwei Molekülen NO.

Das Moleküle wurde in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals durch *Russel Drago* dargestellt (WANG ET AL., 2005). Die Halbwertszeit der Substanz beträgt unter neutralen Bedingungen und bei 37 °C etwa 2 min.

1.3 Modulatoren der NOsGC

Arzneistoffe, die unabhängig von NO die NOsGC aktivierten, wären eine wünschenswerte Erweiterung des therapeutischen Spektrums. NO-Donatoren büßen mitunter schon nach kurzer Therapiedauer ihrer Wirksamkeit ein. Außerdem spricht eine Vielzahl an Patienten mit Herzkreislauferkrankungen nicht auf NO an (CHIRKOV AND HOROWITZ, 2007). Das fehlende Ansprechen wird mit einer unzureichenden NO-Freisetzung aus den organischen Nitraten, einer erhöhten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies und einer damit einhergehenden Inaktivierung von NO erklärt. Außerdem kann bereits eine Hypersensitivität gegenüber Vasokonstriktoren bestehen (STASCH AND HOBBS, 2009). Die Cytoxizität von NO sowie die Induktion einer endothelialen Dysfunktion (THOMAS ET AL., 2007) bei einer längerfristigen

Einleitung

Anwendung von organischen Nitraten limitieren den Einsatz NO als Therapeutikum (STASCH AND HOBBS, 2009). Schon früh wurde entdeckt, dass die eisenfreie Form des Häm *b*, Protoporphyrin-IX (PPIX), ein effektiver NO-unabhängiger Aktivator der NOsGC ist (IGNARRO ET AL., 1982). Therapeutisch ließ sich dieser Befund allerdings nicht nutzen, da PPIX phototoxisch ist⁵. Allerdings findet der PPIX-Präkursor 5-Aminolävulinsäure (Gliolan[®]) Anwendung für diagnostische Zwecke, da das während der Metabolisierung entstehende PPIX aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften zur intraoperativen Visualisierung maligner Gliome⁶ genutzt werden kann (STUMMER ET AL., 2006).

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten Substanzen identifiziert werden, welche die NOsGC unabhängig von NO zu aktivieren vermögen, ohne phototoxisch zu sein. Als Verwalter der Internationalen Freinamen (INN) hat die Weltgesundheitsorganisation diese als Gruppe der Ciguate in ihren Namenskatalog aufgenommen (WHO, 2009). Somit sollen alle Arzneistoffe, welche die NOsGC stimulieren oder aktivieren (vgl. 1.3.1 und 1.3.2) das Namenssuffix „-ciguat“ erhalten. Bisher sind zwei verschiedene Substanzgruppen bekannt, welche die Aktivität der NOsGC in einer NO-unabhängigen Weise zu steigern vermögen. Man spricht von den NOsGC-Stimulatoren (vgl. 1.3.1), die allosterisch wirken und den NOsGC-Aktivatoren (vgl. 1.3.2), deren Wirkweise man als Nitrosylhäm-Mimetika beschreiben könnte (EVGENOV ET AL., 2006).

Damit gehören die Ciguate zur Familie kleiner Moleküle, welche auf die inaktive bzw. nur basal aktive („ruhende“) Konformation zielen und diese in die aktivierte überführen. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass man bei Signaltransduktionen, welche redundant vermittelt werden, nur eine geringe Anzahl an Zielrezeptoren erreichen muss, um eine vollständige Wirkung zu erhalten (ZORN AND WELLS, 2010).

⁵ Eine eingeschränkte Funktion der Ferrochelatase, dem Eisen-einbauenden Enzym, führt zu einer pathologische Anreicherung von PPIX und führt so zur erythropoetischen Porphyrie (BONKOVSKY ET AL., 2008).

⁶ Gliom; Sammelbezeichnung für alle von der Neuroglia (Hüll- und Stützsystem des Nervensystems) ausgehenden Tumoren des zentralen Nervensystems (PSCHYREMBEL AND GRUYTER, 2007).

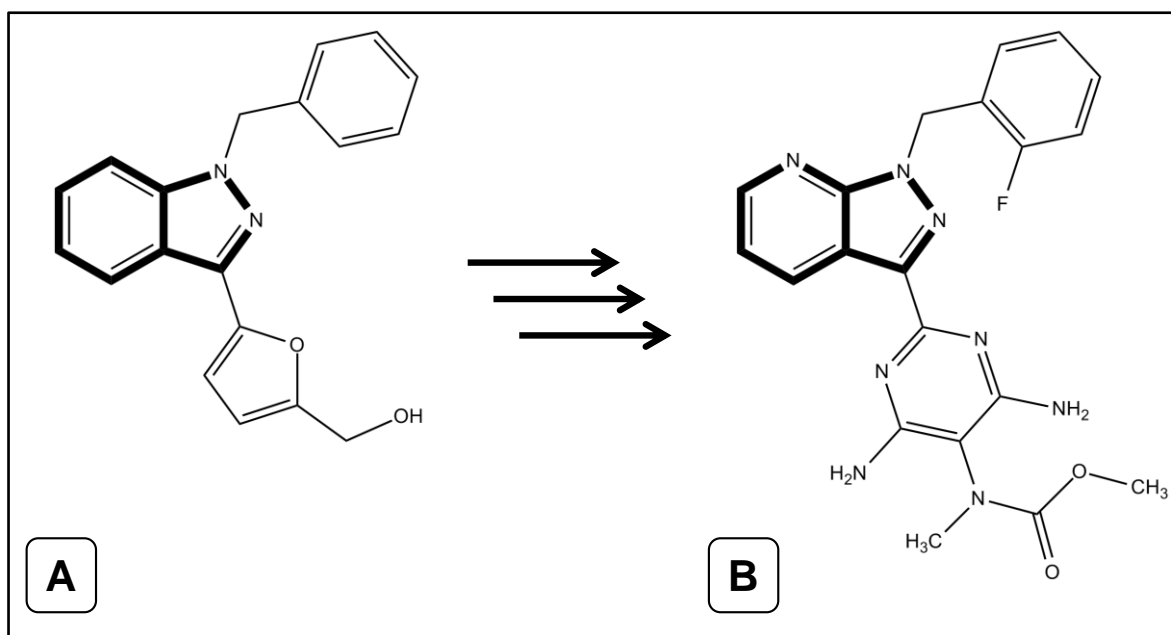
1.3.1 NOsGC-Stimulatoren

Die erste beschriebene Substanz aus der Gruppe der allosterisch wirkenden NOsGC-Stimulatoren war Lificiguat⁷ (YC-1; Abbildung 4A), ein Indazol-Derivat, welches auf der Suche nach Thrombocytenaggregationshemmern entdeckt wurde (KO ET AL., 1994). Die Substanzklasse zeichnet sich durch einen synergistischen Effekt in Gegenwart von NO aus (FRIEBE ET AL., 1998) und vermag die nur geringe Aktivierung (~ 3-fache Stimulation) durch CO auf das Niveau von NO zu heben (FRIEBE ET AL., 1998). Die genaue Bindungsstelle der Substanzen ist noch nicht bekannt. Allerdings konnten durch Photomarkierungs-Studien zwei Cysteine des aminoterminalen Bereichs der α_1 -Untereinheit (BECKER ET AL., 2001; STASCH ET AL., 2001) als mögliche Bindungsregion für BAY 41-2272, einem Riociguat-Analogon, identifiziert werden. Aber auch für eine Bindung in der aminoterminalen Region der β_1 -Untereinheit gibt es Hinweise (DENNINGER ET AL., 2000).

Die Firma *Bayer* hat in den 1990er Jahren ähnliche Verbindungen wie Lificiguat synthetisiert und diese mehrfach optimiert. Mit dem Pyrazolopyridinderivat Riociguat⁸ (BAY 63-2521; Abbildung 4B), entwickelt die Firma zurzeit einen Arzneistoff, der sich schon in der Phase III der klinischen Prüfung befindet. Diese Verbindung wird für die Indikationen pulmonale arterielle Hypertonie und chronisch-thrombo-embolischer Lungenhochdruck geprüft (clinicaltrials.gov). Riociguat vermag angereinigte NOsGC etwa 70-fach zu stimulieren bei einer Konzentration von etwa 100 nM (SCHERMULY ET AL., 2008). In Gegenwart physiologischer Konzentrationen von NO (100 nM) kommt es zu einer synergistischen Aktivierung der NOsGC (FREY ET AL., 2008).

⁷ Lificiguat; YC-1; Lificiguat ist der empfohlene internationale Freiname seit 2007 (WHO Drug Information, Vol. 21, No. 1, 2007 Recommended INN: List 57)

⁸ Riociguat; BAY 63-2521; Riociguat ist der empfohlene internationale Freiname seit 2008 (WHO Drug Information, Vol. 22, No. 3, 2008 Recommended INN: List 60)

**Abbildung 4**

Strukturformeln von Lificiquat (A) und Riociquat (B). Die jeweiligen Grundgerüste (A, Indazol und B, Pyrazolopyridin) sind fett gezeichnet.

1.3.2 NOsGC-Aktivatoren

Die Firma *Bayer* konnte vor etwa zehn Jahren mit Cinaciguat⁹ (BAY 58-2667; Abbildung 5) einen NOsGC-Aktivator identifizieren (STASCH ET AL., 2002). Der EC₅₀-Wert der Substanz liegt bei 10 nM, wobei die Substanz eine etwa 35-fache Stimulation der Enzymaktivität erreichen kann (SCHMIDT ET AL., 2009). Im Gegensatz zu den NOsGC-Stimulatoren wirkt NO bei den NOsGC-Aktivatoren (STASCH ET AL., 2002) nur additiv, jedoch nicht synergistisch. Interessanterweise vermag der NOsGC-Inhibitor ODQ die Wirkung von Cinaciguat deutlich zu steigern (STASCH ET AL., 2002). ODQ oxidiert das zentrale Eisenion des Häms der NOsGC (SCHRAMMEL ET AL., 1996), wodurch die prosthetische Hämgruppe schwächer an die NOsGC gebunden ist (vgl. 1.3.3). Cinaciguat kann unter dieser Bedingung besser an die NOsGC binden. Es kann aber auch direkt die hämfreie NOsGC aktivieren. Unter physiologischen Bedingungen ist eine gewisse Fraktion der NOsGC hämfrei (GLADWIN, 2006). Dies erleichtert vermutlich die Wirkung von Cinaciguat, das nicht den physiologischen Cofaktor Häm aus der Bindungsstelle verdrängen muss. Zudem ist bekannt, dass bereits eine kleine Fraktion aktivierter NOsGC für die biologische

⁹ Cinaciguat; BAY 58-2667; Cinaciguat ist der empfohlene internationale Freiname seit 2008 (WHO Drug Information, Vol. 22, No. 1, 2008 Recommended INN : List 59).

Wirkung ausreicht (MERGIA ET AL., 2006). Da bei kardiovaskulären Erkrankungen die Fraktion hämfreier NOsGC in der Folge vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wächst (STASCH ET AL., 2006), scheint auch eine gezielte krankheitsbezogene Wirkung des Arzneistoffs möglich zu sein.

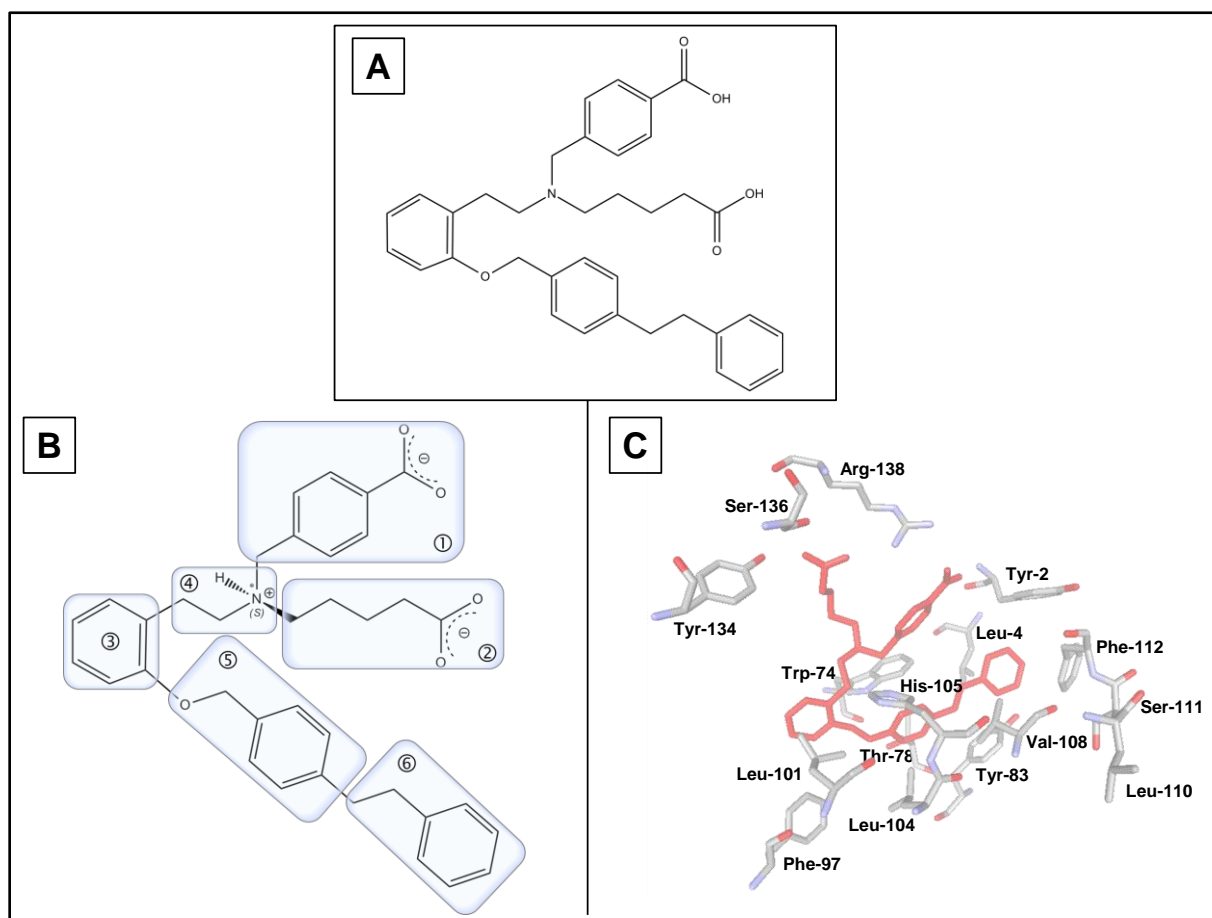
Neben der unmittelbaren Wirkung auf die Enzymaktivität der NOsGC scheint Cinaciguat auch den proteasomalen Abbau des Enzyms zu hemmen. Dies wird auf eine Verhinderung der Ubiquitinylierung¹⁰ der NOsGC zurückgeführt (HOFFMANN ET AL., 2009; MEURER ET AL., 2009). Die Beeinflussung der Stabilität von Proteinen durch ihren Cofaktor ist ein häufig beschriebenes Phänomen. So konnte gezeigt werden, dass Myoglobin und Cytochrom *b*₅₆₂ stabiler sind als die entsprechenden Apoproteine (LANDFRIED ET AL., 2007; ROBINSON ET AL., 1997).

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Cinaciguat konnten 2010 durch die Co-Kristallisation von Cinaciguat in der H-NOX-Domäne aus *Nostoc punctiforme*¹¹ (MARTIN ET AL., 2010) untersucht werden (Abbildung 5). Die Kristallstruktur spricht dafür, dass Cinaciguat die Hämbindetasche in einer ähnlichen Weise besetzt wie NO-Häm. Cinaciguat wird zur Zeit in der Phase II der klinischen Prüfung für die Behandlung der akuten Herzinsuffizienz geprüft (clinicaltrials.gov; TAMARGO AND LÓPEZ-SENDÓN, 2011).

¹⁰ Die Ubiquitinylierung von Proteinen „kennzeichnet“ diese für den Abbau in Proteasomen, den proteolytischen Zellkompartimenten (MÜLLER-ESTERL AND PLENIKOWSKI, 2009).

¹¹ Die bakterielle Aminosäuresequenz von H-NOXA (182 Aminosäuren) ist zu 34 % homolog mit den ersten 184 Aminosäuren der humanen β_1 -Untereinheit der NOsGC.

Einleitung

**Abbildung 5****A Strukturformel von Cinaciguat.**

B Biologisch aktive Konformation und Markierung der Pharmakophore. Das theoretische chirale Zentrum (N) ist markiert und wurde entsprechend der Struktur der Co-Kristallisation (MARTIN ET AL., 2010) von Cinaciguat und H-NOX aus *Nostoc punctiforme* (PDB: 3L6J) sowie der beschriebenen Struktur-Wirkungsbeziehungen (SCHMIDT ET AL., 2009) gezeichnet (S-Konfiguration). Durch die Stickstoff-Inversion (GOSSAUER, 2006) ist die dargestellte Struktur zwar die biologisch aktive, aber nicht die in freier Lösung vorliegende. Aus gleichem Grund entfällt die Angabe der Stereochemie.

Struktur-Wirkungsbeziehungen¹².

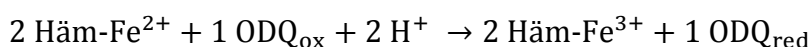
①, Methylbenzoatgruppe interagiert mit R138 und dem Hauptkettenstickstoff von Y2; ②, Pentanoatgruppe interagiert mit dem wichtigen Tripeptidmotiv Y134-X-S136-X-R138 und orientiert den Arzneistoff in der H-NOX-Domäne; ③, Phenylring interagiert mit L101 und stellt ein wichtiges Pharmakophor dar; ④, Ethylaminogruppe interagiert mit H105 und verdrängt dieses (Verschiebung um ~ 0,7 Å) / der positiv geladene Stickstoff könnte eine Kationen- π -Wechselwirkung mit dem W74 eingehen (~ 4,1 Å); ⑤, Benzylethergruppe interagiert mit der hydrophoben Tasche (z.B. L4, T78, Y83, F97, L104 und V108) der H-NOX-Domäne / eine Wasserstoffbrücke ist denkbar zwischen dem Ethersauerstoff und dem Stickstoff des Indolrings von W74 (~ 3,3 Å); ⑥, raumfordernde Ethylbenzolgruppe verdrängt F112 und führt über eine Rotation um ~ 3° der α F-Helix zu einer Verschiebung um ~ 1 Å des L110-S111-Dipeptids und damit zur Aktivierung der NOsGC.

C Ausschnitt aus der Kristallstruktur von Cinaciguat in H-NOXA aus *Nostoc punctiforme* (PDB: 3L6J).

¹² Die Publikation von Martin et al. (MARTIN ET AL., 2010) enthielt in der Vorabversion (12.05.2010) zum Teil weitere Angaben, die in der endgültigen Version (16.07.2010) fehlten.

1.3.3 Der NOsGC-Inhibitor ODQ

Ein selektiver, nicht-kompetitiver Inhibitor der NOsGC ist das Chinoxalinderivat ODQ (GARTHWAITE ET AL., 1995; KOSARIKOV ET AL., 2001). Mittels spektroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ODQ Fe^{2+} -Häm der NOsGC zu Fe^{3+} -Häm zu oxidieren vermag (SCHRAMMEL ET AL., 1996). Die Spezifität von ODQ gegenüber der NOsGC ist konzentrationsabhängig. In äquimolarer Konzentration oxidiert ODQ die NOsGC spezifisch. Bei einem 30-fachen Überschuss von ODQ werden auch andere Hämoproteine wie Hämoglobin oxidiert (ZHAO ET AL., 2000). ODQ kann experimentell zur Charakterisierung oxidierteter NOsGC verwendet werden. Unter oxidativen Bedingungen ist ein Verlust des Häms bei der NOsGC zu beobachten (CRAVEN AND DERUBERTIS, 1978; FRITZ ET AL., 2011). Dies liegt vermutlich daran, dass die koordinative Bindung des Histidin-105 zum Fe^{2+} -Häm stärker ist als zum Fe^{3+} -Häm (REYNOLDS AND BURSTYN, 2000). Unter der Annahme einer oxidationsbedingten Hemmung der NOsGC würde folgende Reaktionsgleichung gelten:



Betrachtet man die Struktur von ODQ (Abbildung 6) so kann folgende Reduktion des NOsGC-Inhibitors postuliert¹³ werden.

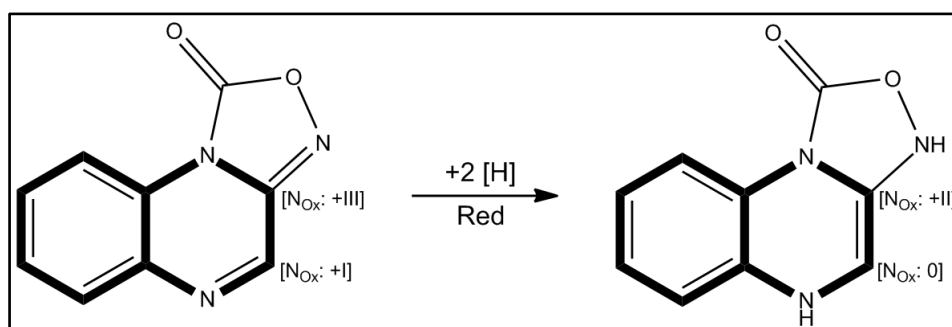


Abbildung 6

Darstellung der **Strukturformel von ODQ** und dessen postulierte Reduktion. Das Chinoxalingerüst ist fett gezeichnet.

¹³ Die Reduktion von ODQ wird in Analogie zur Reduktion von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) zum FADH_2 angenommen, da beide Verbindungen strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Beide weisen folgendes Strukturmerkmal auf: $-\text{N}=\text{CR}-\text{CR}=\text{N}-$, welches beim FAD während der Reduktion zum FADH_2 zu $-\text{NH}-\text{CR}=\text{CR}-\text{NH}-$ reduziert wird (MÜLLER-ESTERL AND PLENIKOWSKI, 2009). Trotz intensiver Recherche über *Pubmed* (vgl. Fußnote 15) und über Struktur-basierte Suchen mittels *SciFinder Scholar* (Chemical Abstracts Service der American Chemical Society in Washington D.C., USA) wurde keine Beschreibung des Reduktionsmechanismus von ODQ gefunden, weshalb obiges Postulat aufgestellt wurde.

1.4 Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylyl-Cyclase

Die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylyl-Cyclase (NOsGC) ist der physiologische Rezeptor für Stickstoffmonoxid (NO) und damit das zentrale Element bei der Signaltransduktion vom NO zum sekundären Botenstoff, cyclisches Guanosinmonophosphat (Abbildung 7).

Gemäß dem Komitee für Nomenklatur der internationalen Union für Biochemie und molekulare Biologie (BIOCHEMISTRY ET AL., 1992), werden Enzyme entsprechend der Reaktion klassifiziert, die sie katalysieren. Nach dieser Nomenklatur handelt es sich bei der NOsGC um eine cyclisierende GTP-Diphosphatlyase. Sie erhielt 1972 die EC-Nummer¹⁴ 4.6.1.2. Löst man die Zahl nach ihrer Bedeutung auf, so steht die 4 für die vierte Hauptgruppe an Enzymen, den Lyasen. Die nachfolgende 6 grenzt das Enzym als Phosphor-Sauerstoff-Lyase näher ein. Die letzten beiden Ziffern führen dann zur eindeutigen Abgrenzung der Guanylyl-Cyclase gegenüber anderen Enzymen, die ebenfalls Phosphor-Sauerstoff-Lyasen sind. Da jedoch nur die katalysierte Reaktion kategorisiert wird, beinhaltet die 4.6.1.2-Gruppe nicht nur die NOsGC sondern auch alle Isoformen der membranständigen Guanylyl-Cyclase (pGC).

Die Bezeichnung als Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylyl-Cyclase findet sich nach einer Durchsicht der bei *PubMed*¹⁵ indizierten Publikationen erstmals 1992 (SHIELLS AND FALK, 1992) und sie sollte spätestens seit 2004 auch konsequent verwendet werden, um Verwechslungen mit anderen Enzymen zu vermeiden. In jenem Jahr wurde eine lösliche Guanylyl-Cyclase beschrieben, die nicht NO-, sondern Sauerstoff-responsiv ist (GRAY ET AL., 2004), weshalb sie auch als atypisch bezeichnet wurde (MORTON, 2004). Damit erfuhr das Präfix-s der GC einen semantischen Wandel, von löslich (*soluble*) zu sensitiv (*sensitive*). Außerdem konnte schon wenige Jahre zuvor gezeigt werden, dass eine NOsGC-Isoform (α_2/β_1)

¹⁴ EC-Nummer: EC steht für *Enzym Commission*. Die EC-Nummer dienen der numerischen Kategorisierung von Enzymen resp. ihrer Reaktionen.

¹⁵ *PubMed* ist ein durch die amerikanischen Nationalbibliothek für Medizin (U.S. National Library of Medicine), bereitgestellter Service der den Zugang zur Datenbank MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*) ermöglicht, welche wiederum von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) betrieben wird. Der öffentliche Zugang zu dieser Datenbank wurde 1997 durch den damaligen Vizepräsidenten der USA Al Gore verwirklicht.

membranär lokalisiert sein kann (RUSSWURM ET AL., 2001) und damit nicht mehr vornehmlich cytosolisch, also löslich, vorliegt.

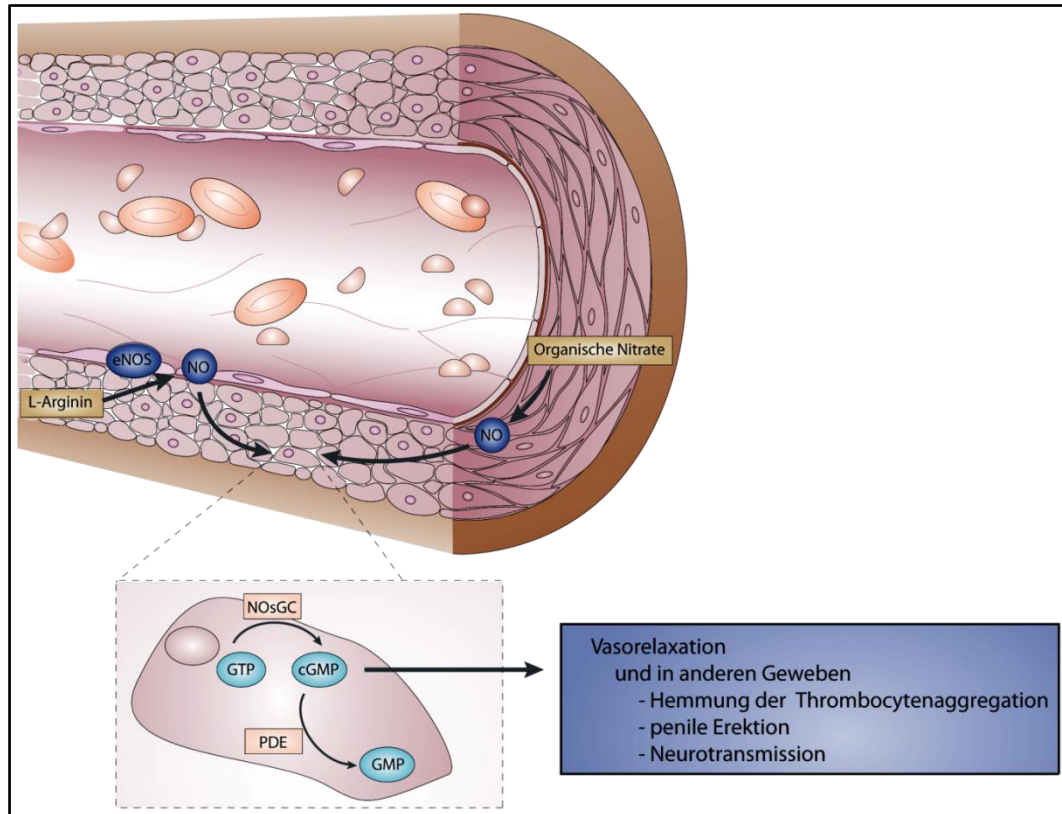


Abbildung 7

Darstellung der Lokalisation der NOsGC in den Gefäßen (modifiziert und erweitert nach EVGENOV ET AL., 2006).

eNOS, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; PDE, Phosphodiesterase

Bislang konnten vier Untereinheiten der NOsGC identifiziert werden: α_1 , α_2 , β_1 und β_2 (zur Übersicht: LUCAS ET AL., 2000). Für die katalytische Aktivität ist entweder eine Heterodimerisierung der α_1 - oder α_2 - mit der β_1 -Untereinheit (HARTENECK ET AL., 1990) oder die Homodimerisierung von β_2 (β_2/β_2) notwendig (KOGLIN ET AL., 2001). Erst durch die Dimerisierung werden die für die Katalyse notwendigen Funktionen bereitgestellt. Am Beispiel der humanen α_1/β_1 -Isoform wird deutlich, dass beide Untereinheiten notwendige Aminosäuren für die Konversion von GTP zu cGMP zur Verfügung stellen (Abbildung 8).

Die α_1/β_1 -Isoform der NOsGC lässt sich in allen Geweben nachweisen, wird aber besonders in der Lunge, dem Gehirn und den Thrombocyten exprimiert, während die α_2/β_1 -Isoform vornehmlich in Gehirn, Lunge, Darm, Herz, Milz, Uterus und Plazenta

gebildet wird (RUSSWURM ET AL., 1998; BUDWORTH ET AL., 1999; MERGIA ET AL., 2003). Die α_2 -Untereinheit verfügt im Gegensatz zur α_1 -Untereinheit über ein PDZ-Bindemotiv¹⁶ (HOFFMÜLLER ET AL., 1999). Daher wird postuliert, dass die α_2 -Untereinheit über Protein-Protein-Interaktionen Bestandteil von Signalkomplexen sein könnte (GARTHWAITE, 2010). Die α_2/β_1 -Isoform ist in vielen Zellen und Geweben an den Membranen lokalisiert und wird somit zuerst vom diffundierenden NO aus benachbarten NOS exprimierenden Zellen erreicht (BELLINGHAM AND EVANS, 2007). Damit könnte der α_2/β_1 -Enzymkomplex die bedeutendere Isoform sein und die vornehmlich cytosolische α_1/β_1 -Isoform die Funktion eines Reserverezeptors (*spare receptors*¹⁷) übernehmen. Die β_2 -Untereinheit zeigt im Gegensatz zur β_1 -Untereinheit eine restriktive Organdistribution und wird vornehmlich in den Nieren exprimiert (für Ratten gezeigt durch YUEN ET AL., 1990), konnte aber auch im menschlichen Herzen nachgewiesen werden (BEHRENDTS ET AL., 1999). Da Behrends und Vehse 2000 zeigen konnten, dass das Gen der humanen β_2 -Untereinheit eine Leserasterverschiebung aufweist (Deletion eines Basenpaares), ist die Bedeutung der β_2 -Untereinheit für die menschliche Physiologie zweifelhaft (BEHRENDTS AND VEHSE, 2000). Auch die Homodimere der β_2 -Untereinheit der Ratte sind nur in der Gegenwart von 4 mM Mn^{2+} (statt Mg^{2+}) durch NO aktivierbar (KOGLIN ET AL., 2001). Die für eine Aktivierung notwendige Mn^{2+} -Konzentration liegt damit weit oberhalb der physiologischen Konzentration¹⁸ von Mn^{2+} -Ionen.

Der einzelne Knockout der α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit (MERGIA ET AL., 2006) bei Mäusen führt zu nahezu gesunden Tieren, die fortpflanzungsfähig sind, allerdings die Fähigkeit der cGMP-vermittelnden Langzeitpotenzierung („Bahnung“) eingebüßt haben (HAGHIKIA ET AL., 2007). Demgegenüber sterben β_1 -defiziente Mäuse bereits

¹⁶ PDZ ist das Akronym der Initialen für PSD-95 (postsynaptic density 95), DLG (discs large); ZO-1 (zonula occludens-1) und wurde aufgrund von Sequenzhomologie in verschiedenen Proteinen identifiziert (KENNEDY, 1995; NOURRY ET AL., 2003).

¹⁷ Das Konzept der *spare receptors* basiert auf der Annahme, dass ein maximaler physiologischer Effekt auch dann möglich ist, wenn nur ein Teil der Rezeptoren besetzt ist (STEPHENSON, 1956). Das ist immer dann möglich, wenn das Signal amplifiziert wird. Auch bei der NOsGC gilt, dass aus einem mol NO über die NOsGC nicht nur ein mol cGMP entsteht.
spare; englisch für Ersatzteil oder Reserveteil (nach HORNBY ET AL., 2010)

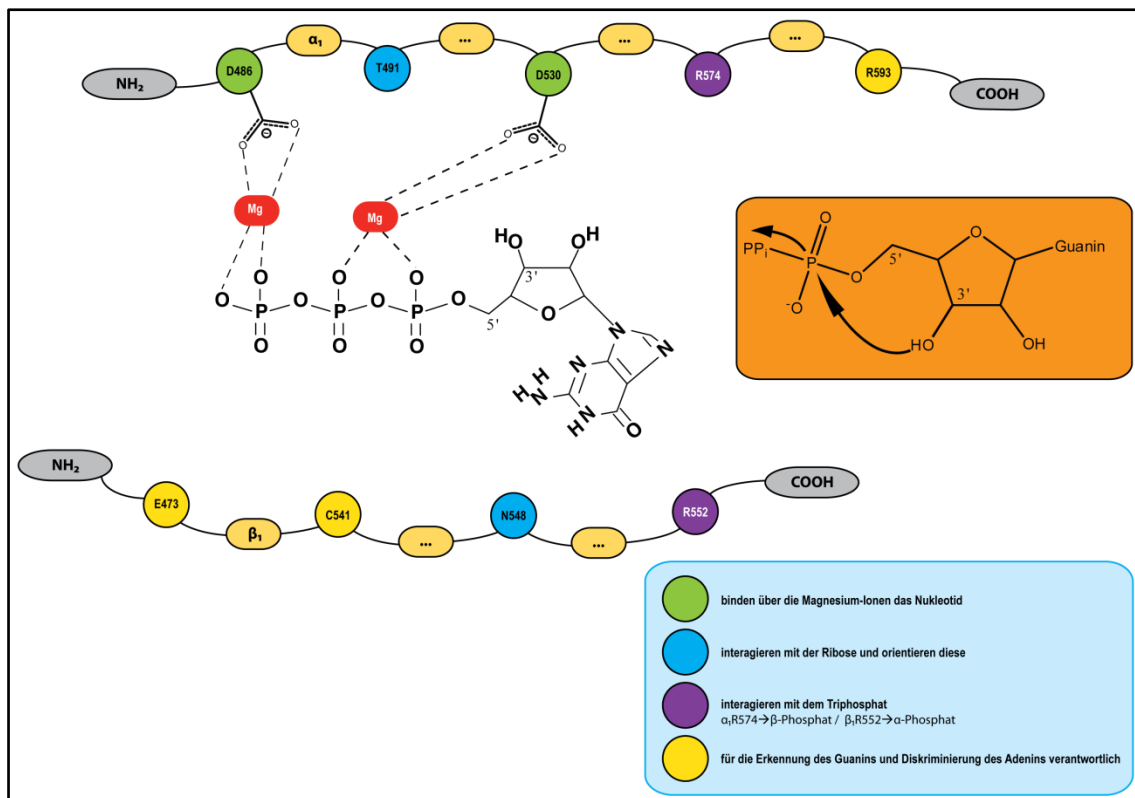
¹⁸ In der Literatur sind Mangan-Konzentrationen von 0,3 – 2,9 $\mu\text{g/g}$ Gewebe beschrieben worden (ASCHNER AND ASCHNER, 2005). Nimmt man der Einfachheit eine Dichte des Gewebes von $1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ an und errechnet die Konzentration für Mangan(II)-chlorid [$\text{MW} \approx 125 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$] so ergeben sich physiologische Konzentrationen von etwa 2 μM bis 25 μM .

nach wenigen Tagen an schweren gastrointestinalen Störungen (FRIEBE ET AL., 2007).

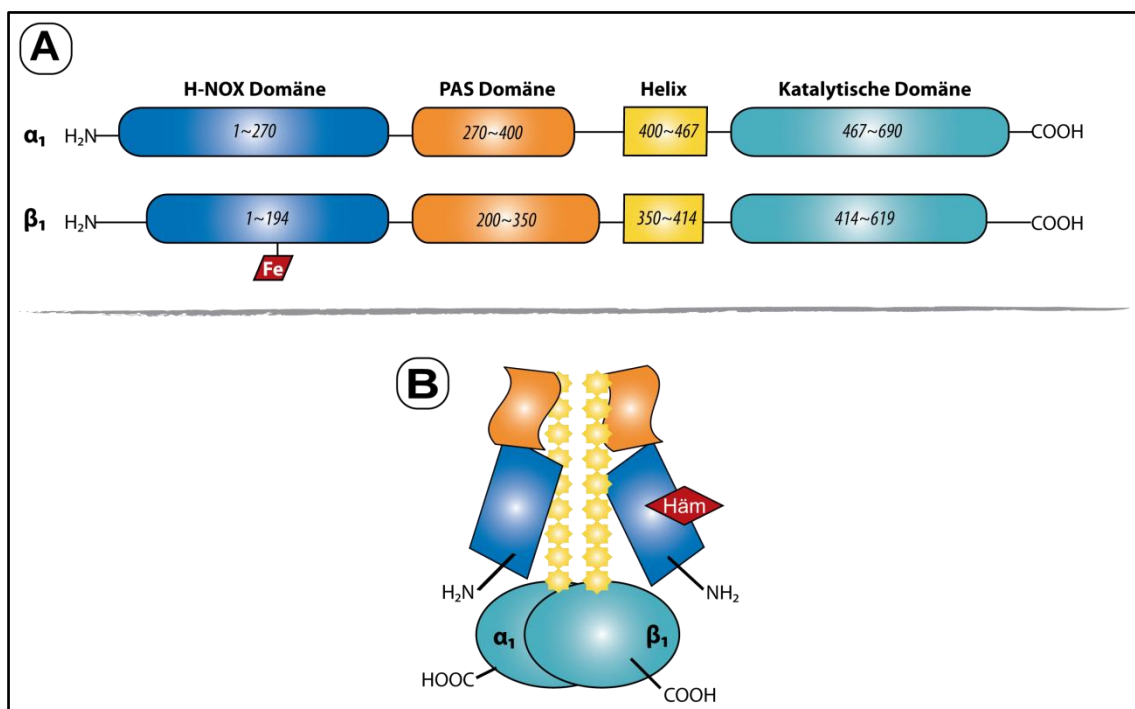
Die Untereinheiten der NOsGC lassen sich in vier Domänen gliedern (Abbildung 9A). Im aminoterminalen Bereich befindet sich die regulatorische Domäne, die H-NOX-Domäne (heme-nitric oxide and oxygen), welche bei der β_1 -Untereinheit den eigentlichen NO-Sensor (bzw. Rezeptor) Häm bindet (KAROW ET AL., 2004). Die Hämbindung erfolgt durch das Histidin-105 (Abbildung 10; WEDEL ET AL., 1994) und das Aminosäuretrio Tyrosin-135, Serin-137 und Arginin-139 (Abbildung 10; SCHMIDT ET AL., 2005). Daran schließen sich die PAS-Domäne¹⁹ (MA ET AL., 2008), die Helix (Doppelwendel, *coiled-coil*) und carboxyterminal die katalytische Domäne (Abbildung 8 und Abbildung 9A; WINGER AND MARLETTA, 2005) an. Eine lineare Beschreibung der Domänenorganisation ermöglicht trotz der stark vereinfachten Darstellung einen Überblick. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Amino- und Carboxy-Termini beider Untereinheiten räumlich nahe beieinander liegen (HAASE ET AL., 2010c; Abbildung 9B).

¹⁹ PAS; Proteininteraktionsdomäne, die man aufgrund von Sequenzhomologien ermittelt hat; PAS = **P**er/**A**RNT/**S**im; Per = *period clock protein* (steuert circadianes Verhalten bei *Drosophila melanogaster*); ARNT = *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (Translokationsrezeptor für cyclische Kohlenwasserstoffe bei Vertebraten; 1991 erstmals für Dioxin beschrieben); Sim = *single minded* (steuert die Ontogenese bei *Drosophila melanogaster*); weisen eine typische Struktur aus Helix/5er-Schleife/Helix auf (MÖGLICH ET AL., 2009).

Einleitung

**Abbildung 8**

Modell der katalytischen Domäne der NOSGC und der durch sie vermittelten Reaktion (nach LIU ET AL., 1997 & DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009). Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der humanen NOSGC.

**Abbildung 9**

Domänenorganisation der NOSGC (A nach DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009 und B nach HAASE ET AL., 2010c).

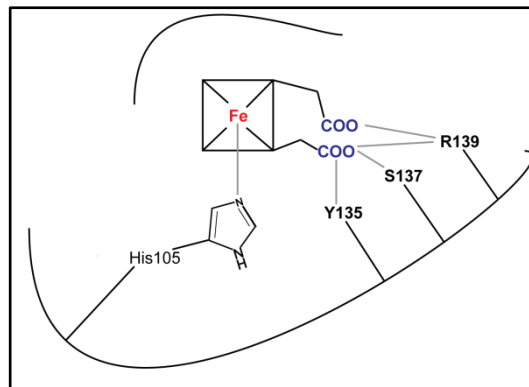


Abbildung 10
Hämbindetasche (modifiziert nach IBRAHIM ET AL., 2010)

Die Dimerisierung der Enzymuntereinheiten konnte bisher nur in Teilen aufgeklärt werden. Die PAS-Domäne bildet zusammen mit der Helix die zentrale Region der NOsGC-Untereinheiten (Abbildung 9). Mutagenesestudien konnten zeigen, dass Veränderungen der Peptidsequenz in diesem Bereich die Dimerisierung beeinträchtigen (ZHOU ET AL., 2004; SHIGA AND SUZUKI, 2005; ROTHKEGEL ET AL., 2007; MA ET AL., 2008).

Im Jahr 2008 beschrieb die Arbeitsgruppe um den Nobelpreisträger *Ferid Murad* drei Spleißvarianten der humanen α_1 -Untereinheit der NOsGC (SHARINA ET AL., 2008). Eine der drei identifizierten Spleißvarianten, die von den Autoren der Studie als „C- α_1 “ bezeichnet wurde, ist eine aminoterminal trunkierte Variante der α_1 -Untereinheit der NOsGC, welche laut den Autoren um 240 Aminosäuren verkürzt ist. Das C- α_1 Protein wird durch zwei unterschiedliche Spleißvarianten gebildet „C- α_1 “ (GenBank™ Nummer: AK226125²⁰) und „C*- α_1 “ (GenBank™ Nummer: BX649180²¹). Das Transkript von C- α_1 fand sich in allen untersuchten Geweben, wohingegen das von C*- α_1 in einigen Geweben (z.B. Herz und Lunge) nicht nachweisbar war. Diese verkürzte Form der α_1 -Untereinheit dimerisiert mit der β_1 -Untereinheit und bildet ein

²⁰ Das Transkript wurde 2006 durch Totoki et al. (Japan) online in GenBank™ veröffentlicht. Das Transkript des Wildtyps ist aus 11 Exonen aufgebaut. C- α_1 fehlt das Exon 4, welches beim Wildtyp das Startcodon enthält. Daher kann erst das nächst folgende Startcodon im Exon 7 genutzt werden.

Das Transkript wurde als eines von fünf Transkripten genutzt, um eine NCBI-Referenzsequenz (NM_001130685) zu erhalten, welche die Transkriptvariante 5 (von insgesamt 7 bisher beschriebenen) angibt.

²¹ Das Transkript wurde 2003 durch Lauber et al. (Deutschland) online in GenBank™ veröffentlicht. Das Transkript des Wildtyps ist aus 11 Exonen aufgebaut. C*- α_1 fehlt ein Teil des Exons 7, wodurch ein Stoppcodon entsteht, so dass das Startcodon auf Exon 7, wie bei C- α_1 genutzt wird.

Einleitung

durch NO stimulierbares Enzym aus. Damit widersprechen die Ergebnisse der Studie einer früheren Arbeit (WAGNER ET AL., 2005), in welcher die Aminosäuren 61 bis 128 für die Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit als notwendig beschrieben wurden (Abbildung 11). In anderen Arbeiten, konnte dagegen gezeigt werden, dass Verkürzungen der α_1 -Untereinheit im aminoterminalen Bereich die Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit nicht beeinflussen (Abbildung 11; KOGLIN AND BEHREND, 2003; ROTHKEGEL ET AL., 2007).

Sharina et al. sehen in der Existenz verschiedener Spleißvarianten einen Regulationsmechanismus, welcher die Funktion der NOsGC in verschiedenen Geweben modulieren könnte. In einer drei Jahre später veröffentlichten Studie (SHARIN ET AL., 2011) beschreiben die Autoren, dass die C- α_1 -Variante der NOsGC bei der Entwicklung humaner embryonaler Stammzellen bedeutsam ist. Aufgrund dieser entwicklungsbiologischen Bedeutung des C- α_1 -Proteins erschien es notwendig, das Dimerisierungsverhalten dieser Spleißvariante näher zu charakterisieren.

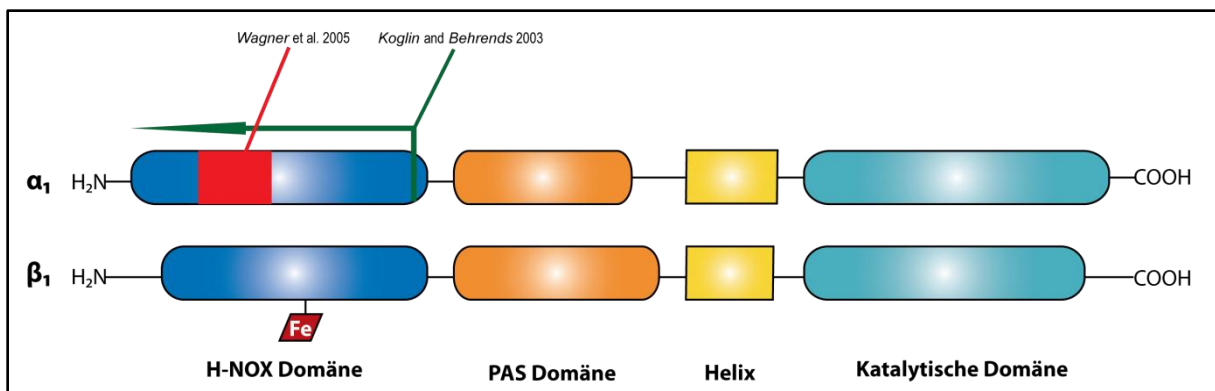


Abbildung 11

Darstellung der von *Wagner* et al. (WAGNER ET AL., 2005) beschriebenen essentiellen Aminosäuren für eine Dimerisierung der α_1 - mit der β_1 -Untereinheit (rotes Rechteck) und Skizzierung der von *Koglin* und *Behrends* (KOGLIN AND BEHREND, 2003) durchgeführten Deletion (grüner Pfeil).

2. Zielsetzung und Fragestellung

Inwieweit ist die erst kürzlich (2008) beschriebene Spleiß-Variante der α_1 -Untereinheit der NOsGC zur Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit fähig und bildet sie hiernach ein katalytisch aktives Enzym aus? Lassen sich Besonderheiten bei der subzellulären Lokalisation der Spleißvariante nachweisen?

Welchen Einfluss hat eine weitergehende aminoterminal Trunktion der α_1 -Untereinheit auf die Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit?

Welche Auswirkungen zeigen sich auf das Dimerisierungsverhalten, wenn die hämbindende Domäne (H-NOX) der β_1 -Untereinheit entfernt wird oder eine hämfreie Mutante (H105A) eingesetzt wird?

Lässt sich ein Austausch zwischen den verschiedenen Untereinheiten der NOsGC-Dimere nachweisen?

Ist es möglich enzymatisch aktive Dimere der NOsGC in einem prokaryotischen System oder mit Hilfe von zellfreien Systemen zu exprimieren? Sind Supplemente denkbar, welche für diese Expressionssysteme hilfreich sein könnten?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Zellkulturreagenzien

Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Aluminiumoxid	MP Biomedicals (Illkirch, F)
5-Aminolävulinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Avidin	IBA Biotechnology (Göttingen)
Benzamidin	Fluka (Buchs, CH)
Blue Dextran 2000	GE Healthcare (München)
Bluo-gal	Invitrogen (Darmstadt)
Brillantblau G 250	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Cinaciguat (BAY 58-2667)	Bayer Pharma AG (Wuppertal)
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten™ (PIC)	Roche Applied Science (Mannheim)
Diethylentriamin/Stickstoffmonoxid Addukt [Diethylammonium(Z)-1-(N,N- diethylamino)diazon-1-ium-1,2-diolat (DEA/NO)]	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
D-Desthiobiotin	Iba (Göttingen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)

Ethylendiamintetraacetat-tetranatriumsalz (EDTA)	Applichem (Darmstadt)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Geneticin (G-418)	PAA (Cölbe)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat, Mononatriumsalz (cGMP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
[α - ³² P]-Guanosintriphosphat (GTP)	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Guanosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (GTP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hämin (porciner Ursprung)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hefe-Extrakt	Roth (Karlsruhe)
Heat Shock Protein HSP 70 (human, rekombinant)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Heat Shock Protein HSP 90 (aus Rinderhirn)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Creatinphosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lifigiquat (YC-1)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)

Material und Methoden

Manganchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
β -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Perchlorsäure	Merck (Darmstadt)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare (München)
<i>Strep-Tactin</i> [®] Superflow [®] high capacity	IBA Biotechnology (Göttingen)
Triethanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl (TRIS)	Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanacetat	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween-20	Merck (Darmstadt)
Zinkacetat	Merck (Darmstadt)

Die Chemikalien wurden, sofern nichts anderes angegeben wurde, vom Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) oder „für die Molekularbiologie“ verwendet.

3.1.2 Stammlösungen

Cinaciguat (10 mM)	in 100 % (V/V) DMSO
DEA/NO (10 mM)	in 10 mM NaOH

3.1.3 Lösungen, Puffer, Medien und Marker

Acryl-/Bisacrylamid Lösung (30 %)	Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
Blaupuffer für die SDS-PAGE	50 mM TRIS; 1 % SDS (m/V); 100 mM DTT; 30 % Glycerol; 0,02 % Bromphenolblau (m/V); pH 7,0
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver (m/V) in TBST
100-fach BSA	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
BugBuster® Protein Extraktion Reagenz	Merck (Darmstadt)
Coomassie Färbelösung	0,02 % Brillantblau G 250 (m/V); 5 % Aluminiumsulfat-(14- 18)-Hydrat (m/V); 10 % Ethanol (96 %) (V/V); 2 % ortho-Phosphorsäure (m/V) (KANG ET AL., 2002)
Coomassie Entfärbelösung	10 % Ethanol (96 %) (V/V); 2 % ortho-Phosphorsäure (m/V) (KANG ET AL., 2002)
D-MEM (High Glucose) – ohne Phenolrot	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco Products Invitrogen Corporation, Grand Island, USA)
6-fach DNA-Probenpuffer	10 mM TRIS; 60 mM EDTA; 60 % Glycerol (V/V); 0,03 % Bromphenolblau (m/V); 0,03 % Xylencyanol (m/V); pH 7,6
DNA Standard	GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)
Fetales Rinderserum	Fetal Bovine Serum „GOLD“, EU-approved (PAA, Cölbe)
Gentamycin	50 mg/ml (Gibco Products Invitrogen Corporation, Grand Island, USA)
Gelfiltrationspuffer	50 mM TEA, 250 mM NaCl, pH 8,0

Material und Methoden

<u>H</u> anks' <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution (HBSS)	1,26 mM CaCl ₂ , 0,493 mM MgCl ₂ , 0,407 mM MgSO ₄ , 5,33 mM KCl, 0,441 mM KH ₂ PO ₄ , 4,17 mM NaHCO ₃ , 137,93 mM NaCl, 0,338 mM Na ₂ HPO ₄ , 5,56 mM Glucose (HANKS AND WALLACE, 1949) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
IP-Waschpuffer	50 mM TRIS; pH 8,0
Kanamycin	50 mg/ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
LB Agar	LB Medium + 1,5 % Agar (m/V) (BERTANI, 1951)
LB Medium – Variante nach Miller	1 % Trypton (m/V); 0,5 % Hefeextrakt (m/V); 1 % NaCl (m/V); pH 7,0 (BERTANI, 1951; MILLER, 1972)
<u>L</u> ipid <u>M</u> edium <u>S</u> upplement (LMS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lösung I für Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräp)	50 mM Glucose; 25 mM TRIS; 10 mM EDTA; 600 µg/ml Lysozym; 10 mg/ml RNase A; pH 8,0 (Lysozym und RNase wurden stets frisch zugesetzt)
Lösung II (Minipräp)	200 mM NaOH; 1 % SDS (m/V)
Lösung III (Minipräp)	3 M Kaliumacetat; 12 % Essigsäure (V/V)
Lysispuffer	50 mM Triethanolamin (TEA); 1 mM EDTA; 10 mM DTT; PIC (1 Tabl. auf 50 ml); pH 7,4
Natriumacetatlösung	3 M Natriumacetat; pH 4,8
PBS-Lysispuffer	PBS; 1 mM DTT; PIC (1 Tabl. auf 50 ml); pH 7,4
<u>P</u> hosphat gepufferte <u>S</u> alzlösung (PBS)	1,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 150 mM Natriumchlorid; 5,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat; pH 7,4
Penicillin/Streptomycin	100-fach (PAA, Cölbe)
Ponceau S Färbelösung	0,5 % Ponceau S (m/V); 1 % Eisessig (V/V)
Proteinstandards	PageRuler™ Unstained Protein Ladder PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

S-Adenosylmethionin (SAM)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
6%iges Sammelgel für die SDS-PAGE (pro Gel)	<ul style="list-style-type: none"> • 1,45 ml Reinstwasser • 2,5 ml 2-fach Sammelgelpuffer • 1 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid Lösung • 3 µl TEMED • 60 µl 10%ige (m/V) Ammoniumpersoxodisulfatlösung (in Reinstwasser)
2-fach Sammelgelpuffer	250 mM TRIS; 0,2 % SDS (m/V); pH 6,8
10-fach Laufpuffer für die SDS-PAGE	250 mM TRIS; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (m/V); pH 8,3-8,8
2-fach Probenpuffer für die SDS-PAGE	50 mM TRIS; 1 % SDS (m/V); 100 mM DTT; 30 % Glycerol (V/V); pH 7,0
SB-Medium (Super Broth)	3,2 % Trypton (m/V); 2 % Hefeextrakt (m/V); 0,5 % NaCl (m/V); pH 7,0
Sf-900II™ SFM Medium	Invitrogen (Darmstadt)
SOC Medium	1 % Trypton (m/V); 0,5 % Hefeextrakt (m/V); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose (HANAHAN, 1983)
Strep Waschpuffer	100 mM TRIS; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Benzamidin; 10 mM DTT; pH 8,0
Strep Elutionspuffer	100 mM TRIS; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Benzamidin; 10 mM DTT; 2,5 mM D-Desthiobiotin; pH 8,0
Strep Regenerationspuffer	100 mM TRIS; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM HABA ; pH 8,0
TB-Medium	<ol style="list-style-type: none"> 1. 900 ml Reinstwasser; 12 g Trypton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml Glycerol → autoklavieren 2. Zugabe von 100 ml steriler (autoklavierter) Kaliumphosphat-Lösung (23,1 g KH₂PO₄ + 125,4 g K₂HPO₄ auf 1.000 ml Wasser) <p>Es resultiert ein pH-Wert von etwa 7,2.</p>

Material und Methoden

IRIS-Acetat-EDTA Puffer (TAE)	40 mM TRIS-Acetat; 0,1 mM EDTA; pH 8,0
10-fach IRIS-gepufferter Salzlösung mit Tween (TBST)	1,5 M NaCl; 100 mM TRIS; 1 % Tween 20 (V/V)
10-fach Transferpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 0,2 % SDS (m/V); pH 8,3
8%iges Trenngel für die SDS-PAGE (pro Gel)	<ul style="list-style-type: none"> • 3,5 ml Reinstwasser • 1,875 ml 2-fach Trenngelpuffer • 2 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid Lösung • 7,5 µl TEMED • 75 µl 10 % (m/V) Ammoniumperoxodisulfat (in Reinstwasser)
4-fach Trenngelpuffer	1,5 M TRIS; 0,4 % SDS (m/V); pH 8,8
Trypanblau-Färbelösung	0,02 % Trypanblau (m/V) in 1 x PBS
Whole-Cell-Buffer	140 mM KCl, 1,0 mM MgCl ₂ , 2,0 mM CaCl ₂ , 5 mM HEPES, 10 mM EGTA Mit Reinstwasser auffüllen und pH 7,15 mit 1 M KOH einstellen. Salze lösen sich erst vollständig während der pH-Wert-Einstellung.

Für die Herstellung der Lösungen wurde, wenn nichts anderes angegeben, Reinstwasser (Ultra Clear UV, SG, Barsbüttel) verwendet.

Selbst hergestellte Lösungen, deren Sterilität gewährleistet werden musste, wurden mittels Autoklavierung (20 min bei 121 °C und $2 \cdot 10^5$ Pa) in einem Tischautoklaven (DX 90) der Firma Systec (Wettenberg) sterilisiert. Die einwandfreie Funktion des Autoklaven wurde quartalsweise mit Hilfe des Testkeims *Geobacillus stearothermophilus* (LIOFILCHEM, Roseto, I) überprüft.

3.1.4 DNA und Vektoren

pcDNA3.1/V5-His-TOPO	Invitrogen (Darmstadt)
pCMV-HA	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen (Darmstadt)
pCR [™] 4-TOPO [®]	Invitrogen (Darmstadt)
pECFP-C1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pECFP-C2	Eingenherstellung
pECFP-N1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pEGFP-C1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pEGFP-C2	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pETDuet [™] -1	Novagen [®] (Vertrieb über Merck, Darmstadt)
pET [™] -20b(+)	Novagen [®] (Vertrieb über Merck, Darmstadt)
pEYFP-C1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pEYFP-N1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pFastBac [™] Dual	Invitrogen (Darmstadt)
pFastBac [™] 1	Invitrogen (Darmstadt)
pIX4.0	Qiagen (Hilden)
pLPCX	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pUC19	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

3.1.5 Enzyme und Reagenziensysteme

Anti-HA Affinity Matrix und dazugehöriges HA Peptide	Roche Applied Science (Mannheim)
Cellfectin [®] II	Invitrogen (Darmstadt)
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
EasyXpress [®] Protein Synthesis Kit	Qiagen (Hilden)
Gel Filtration HMW Calibration Kit	GE Healthcare (München)
Creatinkinase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Material und Methoden

Lipofectamine™ LTX & Plus Reagenz	Invitrogen (Darmstadt)
Lumi-LightPlus™ Western Blotting Substrat	Roche (Mannheim)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Mung Bean Nuclease	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>Pfu</i> -turbo DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<u>P</u> rotein <u>D</u> isulfid <u>I</u> somerase (PDI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PURExpress® <i>In Vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen (Darmstadt)
QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenese Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
QuikChange® Site-Directed Mutagenese	Agilent Technologies (Waldbronn)
RNase A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<u>S</u> hrimp <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase (SAP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Silberfärbe-Kit (PlusOne Silver Staining Kit, Protein)	GE Healthcare (München)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen (Darmstadt)
TOPO TA Klonierungsreagenziensystem	Invitrogen (Darmstadt)

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) oder Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

3.1.6 Antikörper

- anti- α_1 sGC Antikörper (G4280; aus Kaninchen; WB: 1:5.000 / IHC: 1:100) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
- anti- α_1 sGC Antikörper (AK 1200; aus Kaninchen; WB: 1:1.000) von Eurogentech (Köln)
(Zur Herstellung des spezifischen Antiserums siehe KOGLIN AND BEHREND, 2003)
- anti- α_2 sGC Antikörper (AK 13; aus Kaninchen; WB: 1:2.000 / IHC: 1:50) von Eurogentech (Köln)
[Die Herstellung des spezifischen Antiserums erfolgte wie bei *Bamberger et al.* (BAMBERGER ET AL., 2001) beschrieben, allerdings wurde bei diesem Antiserum das Epitop geringfügig abgewandelt (\rightarrow H₂N- PKPPKPSLSSSRIKKC-COOH)]
- anti- β_1 sGC Antikörper (G4530; aus Kaninchen, WB: 1:4.000 / IHC: 1:50) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
- anti-HA Antikörper (H6908; aus Kaninchen, WB: 1:2.000) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
- anti-HSP70 Antikörper (SPA-757; aus Kaninchen, WB: 1:2.000) von Assay Designs (Ann Arbor, USA)
- anti-HSP90 Antikörper (SPA-846; aus Kaninchen, WB: 1:2.000) von Assay Designs (Ann Arbor, USA)
- anti-Rabbit IgG HRP-linked Antikörper (7074; aus Ziege; WB: 1:2.000) von Cell Signalling (Distribution durch New England Biolabs, Frankfurt am Main)

3.1.7 Zellen

3.1.7.1 Bakterienstämme

- MAX Efficiency® DH10Bac™ kompetente Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)
- One Shot® TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)
- dam⁻/dcm⁻ kompetente *E. coli* Zellen (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Agilent Technologies, Waldbronn)
- BL21(DE3)pLysS (ein Geschenk von Professor *Ludger Beerhues*, Braunschweig)

Alle oben aufgeführten Zellen sind Derivate des *E. coli* Stammes K12.

3.1.7.2 Eukaryotische Zelllinien

- HEK-293 Zellen
[Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig]
- Sf9 Zellen
(Invitrogen, Karlsruhe)
- Sf9 Easy Titer Zellen (Sf9ET)
[National Institutes of Health (NIH), Rockville, USA]

3.1.8 Gewebe

- Großhirn von neonatalen (Tag 1 – 4 p.n.) und adulten (Tag 90 – 120 p.n.) Wistar-Ratten (ursprünglich: Charles River Laboratories Inc., Wilmington, USA)
(Zentrale Einrichtung für Tierhaltung der TU Braunschweig, Braunschweig)
Die Organe wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit, sondern für vorangegangenen Untersuchungen (HAASE ET AL., 2010b) bereits gewonnen und standen somit als Institutsbestand zur Verfügung.

3.1.9 Oligonukleotide

α_1 D530A (human) | α_1 WT und $\alpha_1\Delta N_{259}$ ²²

P344 5' -GTG GAG ACC ATT GGC GCT GCC TAT TGT GTA GCT-3'

P345 5' -AGC TAC ACA ATA GGC AGC GCC AAT GGT CTC CAC-3'

β_1 H105A (human)

P329 5' -GAA CCT TGA TGC TCT GGC CGA CCA CCT TGC TAC C-3'

P330 5' -GGT AGC AAG GTG GTC GGC CAG AGC ATC AAG GTT C-3'

Klonierung von C- α_1 ($\alpha_1\Delta N_{259}$, human) → *SpeI*-Erkennungssequenz

P216 5' -GCG AGT TTG TGA ATC AGC CCT ACT AGT TGT ACT CCG-3'

P217 5' -CGG AGT ACA ACT T AGT AGG GCT GAT TCA CAA ACT CGC-3'

Optimierung der *Kozak* Sequenz in $\alpha_1\Delta N_{364}$ (human)

P342 5' -GCG GAA TTC AAA GGA GAA ATC TTC AGC CGC CAT GGA CCT
CAA AGG CCA AAT GAT C-3'

P343 5' -GAT CAT TTG GCC TTT GAG GTC CAT GGC GGC TGA AGA TTT
CTC CTT TGA ATT CCG C-3'

RT-PCR von β_1 der Ratte

P141 5' -CCG ACA CCA TGT ACG GTT TTG TGA-3'

P180 5' -GGG CCC AGT TTT CAT CCT GGT TTG TTT CCT-3'

PCR-Primer zur Fusion eines carboxyterminalen *Strep* Tag II mit α_2 (rat)

P280 5' -AAG ACC CAT TCA GAT GCG GAT AGG-3'

P281 5' -TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CAA GAG GCT AGT TTC
TCG GAG GAA CAT CG-3'

Amplifikation von α_1 (rat)

P178 5' -ACA CCG GCT AAT AAG GAG GAA ACC AC-3'

P179 5' -ATC TAC CCC TGA GGC CTT GCC TAA GAA-3'

²² Nachfolgend verwendete Nomenklatur mit der Kennzeichnung „ ΔN_{Zahl} “ beschreibt eine Trunkierung von Aminosäuren im aminoterminalen Bereich, wobei die tiefgestellte Zahl die erste Aminosäure (M) im verkürzten Konstrukt angibt.

Amplifikation von α_1 (rat) zur Einführung der Erkennungssequenzen für *BsrGI* (5') und *XbaI* (3')

P270 5' -GAT CGT GTA CAA GAT GTT CTG CAG GAA GTT CAA AG-3'

P271 5' -GAT CGT CTA GAT TAA TCT ACC CCT GAG GCC TTG CC-3'

PCR-Primer zur Fusion eines carboxyterminalen *Strep Tag II* mit α_1 (rat)

P289 5' -AGC AGC TCT GGC AAG GAC AAA T-3'

P290 5' - TCT AGA TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA ATC
TAC CCC TGA GGC CTT GCC TAA G-3'

PCR-Primer zur Fusion eines carboxyterminalen *Strep Tag II* mit β_2 (human) und Einführung einer *XbaI* (3') Erkennungssequenz

P336 5' -ACT AGT GCT ACA AGT CCA CAT CCA GAG-3'

P337 5' -TCT AGA TTA TTT TTC GAA CGT CGG GTG GCT CCA GAA AGC
AGA CAG CAC AGG-3'

Oligonukleotide zur Einführung eines Startmethionins und der Erkennungssequenz für *XhoI* in α_1 -ECFP in pECFP-N1 sowie Optimierung der *Kozak* Sequenz

P338 5' -GAA CCA GCC CTA TTT GCT CGA GTC GGT CGC CAT GGA GAG
CAC CAA GCC TTC TCT-3'

P339 5' -AGA GAA GGC TTG GTG CTC TCC ATG GCG ACC GAC TGG AGC
AAA TAG GGC TGG TTC-3'

Oligonukleotide zur Einführung der Erkennungssequenz für *HindIII* in α_1 -ECFP in pECFP-N1 sowie Optimierung der *Kozak* Sequenz

P340 5' -GAG GAG ATG GGA TAA CTT AGT GAA GAA AGC TTC AAG CGC
CAT GGA CCT CAA AGG T-3'

P341 5' -ACC TTT GAG GTC CAT GGC GCT TGA AGC TTT CTT CAC TAA
GTT ATC CCA TCT CCT C-3'

Amplifikation der humanen Hämoxygenase-1

P256 5' -CCC AGC ACC GGC CGG ATG GAG-3'

P257 5' -TTC AGT GCC CAC GGT AAG GAA GC-3'

α_1 (human) in pcDNA3.1/V5-His-TOPO

P138	5' -CAA CAC CAT GGC CTG CAC GAA-3'
------	------------------------------------

P187	5' -GGT ACC TAA TCT ATT CCT GAT GCT-3'
------	--

Oligonukleotide zur Einführung der Erkennungssequenz für SexAI in β_1 -S (rat) von Geneart

P407	5' -CTG TTC ACC CAG CAG AAC CAG <u>g</u> TC ACG GGT TGC ATC ATG CAG CGG-3'
------	---

P408	5' -CCG CTG CAT GAT GCA ACC CGT GA <u>c</u> CTG GTT CTG CTG GGT GAA CAG-3'
------	---

Überprüfung der Bacmid DNA

M13_f	5' -CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'
-------	---------------------------------------

M13_r	5' -AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'
-------	---------------------------------------

Die verwendete Nummerierung dient nur der institutsinternen Identifizierung der Primer.

Etwaige Mutationen sind durch Fettschrift und Unterstreichung markiert. Zur besseren Orientierung wurde eine dicktengleiche Schriftart für die Angaben der Oligonukleotidsequenz verwendet.

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden im HPLC-Reinheitsgrad von der Firma *biomers.net* (Ulm) bezogen.

3.1.10 Hilfsmittel und Geräte

Agarosegelkammern	SciePlas	Herolab (Wiesloch)
Analysenwaage	PT210	Sartorius (Göttingen)
Anaerobe Werkbank	Bactron II	Sheldon (Cornelius, USA)
Brutschrank (<i>E.coli</i>)	Kelvitron®	Heraeus (Hanau)
Brutschrank (<i>Sf9</i>)	Stabilitherm	Thermo (Waltham, USA)
Chromatographiesäule(n)	Tricorn™ 10/20	GE Healthcare (München)

Material und Methoden

CO ₂ -Inkubator (HEK-293)	InCusafe	Sanyo (München)
Digitalwaage	BP210D	Sartorius (Göttingen)
ECL Dokumentationsanlage	ChemiLux	Intas (Göttingen)
Eismaschine	AF 200	Scotsman (Milan, I)
Elektrophorese-Apparatur	Mini-PROTEAN	Biorad (München)
Filterpapier	3MM	Biorad (München)
Fluoreszenzmikroskope	Axio Scope	Zeiss (Göttingen)
Fluoreszenz Spektrophotometer	Cary Eclipse	Varian (Darmstadt)
Fluoreszenz-Plattenleser	Wallac Victor ² 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Rodgau)
Gefrierschränke	-20 °C	Liebherr (Ochsenhausen)
Geldokumentationsystem	Gel IX Imager	Intas (Göttingen)
Hitzesterilisator	UT20	Heraeus (Hanau)
Nitrocellulose	Hybond ECL	GE Healthcare (München)
Kontaminationsmonitor	LB 1210	Berthold (Bad Wildbad)
Kühlschränke	4 °C	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhen	-80 °C	GFL (Burgwedel) Sanyo (München)
Kühltruhe	-150 °C	Sanyo (München)
Kryostat-Mikrotom	MICROM H550	Thermo Scientific (Walldorf)
Laser-Scanning-Mikroskop	A1	Nikon (Düsseldorf)
Magnetrührer	KMO2 basic	IKA (Staufen)
Mikroskop	invers, ID03	Zeiss (Jena)
PCR-Thermocycler	Primus advanced	Peqlab (Erlangen)

pH-Meter	InLab [®]	Mettler-Toledo (Greifensee, CH)
Pipetten	P10; P20; P100; P200; P1000	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfen	pipetus [®] akku	Hirschmann (Eberstadt)
Power Supply	PowerPac300	Biorad (München)
Power Supply	EV231	Peq Lab (Erlangen)
Proteinchromatographie	ÄKTA Purifier 100	GE Healthcare (München)
Reinraumwerkbänke	Herasafe	Heraeus (Hanau)
Reinstwasseranlage	Ultra Clear	SG (Barsbüttel)
Schüttelinkubator (<i>Sf9</i>)	Excella E24	New Brunswick (Edison, USA)
Schüttelinkubator (<i>E.coli</i>)	Innova 4300	New Brunswick (Edison, USA)
Semi-Dry Elektrobloetter	Sedec [™] M	Peq Lab (Erlangen)
Spritzen	2 ml; 20 ml; 60 ml	B.Braun (Melsungen)
Spritzensterilfilter	0,45 µm; 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Szintillationsgefäße	20 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Szintillationszähler	LS 6500	BeckmanCoulter (Palo Alto, USA)
Taumelschüttler	WT 12	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Fresco 21	Thermo (Waltham, USA)
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus	Bandelin (Berlin)
Umlauferhitzer	Proportional	Haake (Karlsruhe)
UV/Vis Spektrophotometer	Cary Scan 50	Varian (Palo Alto, USA)

Material und Methoden

UV/Vis Spektrophotometer	Nanophotometer	Implen (München)
Vortexer	MS3 basic	IKA (Staufen)
Wasserbad	Typ 1003	GFL (Burgwedel)
Zentrifugalfilter	Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membrane, 30 kDa	Millipore (Schwalbach)
Zentrifuge	Multifuge IS-R	Thermo (Waltham, USA)
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)

Sämtliche Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und für die Routinearbeiten wurden von den Herstellern *Sarstedt* (Nümbrecht), *Eppendorf* (Hamburg), *Greiner Bio-One* (Frickenhäusen) oder *Corning* (Corning, USA) bezogen. Für die Arbeiten mit angereinigten Proteinen und DNA wurden Reaktionsgefäße der Firma *Eppendorf* verwendet, deren Adsorptionsneigung für Proteine oder DNA reduziert ist (Eppendorf LoBind®).

Sämtliche verwendeten Glasgefäße wurden von der Firma *Schott* (Mainz) bezogen und bei Bedarf 30 min bei 180 °C hitzesterilisiert.

3.1.11 Software

Zur Datenverarbeitung wurde folgende Software eingesetzt.

ChemBioDraw Ultra 12.0	CambridgeSoft (Cambridge, USA)
ClustalW 2.1	<u>E</u> uropean <u>M</u> olecular <u>B</u> iology <u>L</u> aboratory (EMBL, Heidelberg) ²³
DeepView – Swiss-PdbViewer 4.0.2	SIB Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, CH) ²⁴
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Powerpoint 2010	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
EndNote X3	Thomsen Reuters (Carlsbad, CA)
LabImage 1D	Kapelan (Leipzig)
PyMOL 1.3r1 edu	Schrödinger (Cambridge, USA)
SigmaPlot 10	Systat Software GmbH (Erkrath)

²³ Entwickler: THOMPSON ET AL., 1997 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)

²⁴ Entwickler: GUEx AND PEITSCH, 1997 (www.expasy.org/spdbv)

3.2 Molekularbiologische Methoden

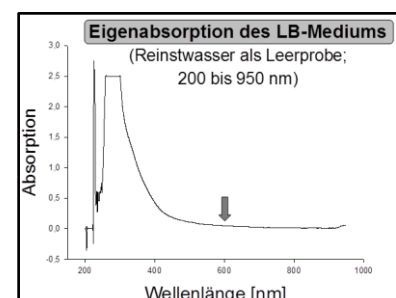
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und deren Transformation

One Shot® TOP10 kompetente Zellen (*E. coli*) der Firma *Invitrogen* (Darmstadt) wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml SB-Medium inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 100 ml SB-Medium in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit 1 ml des Inokulums (Übernachtskultur) versetzt. Bei einer optischen Dichte (OD_{600}^{25}) von 0,6 (gleiche Wachstumsbedingungen wie bei der Übernachtskultur) gegen SB-Medium als Referenz wurde die Kultur zu je 50 ml in 50-ml-Röhrchen aufgeteilt und bei jeweils 4.500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 25 ml 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Bedingungen wie zuvor) wurden die Bakterienpellets mit 10 ml $CaCl_2$ -Glycerol-Lösung [100 mM; 20 % (V/V)] suspendiert und in 250 µl Aliquots portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Dauerlagerung erfolgte bei -80 °C.

Mit Hilfe einer definierten Menge des pUC19-Vektors wurde unmittelbar nach dem Schockgefrieren die Transformationseffizienz (TE) bestimmt. Der Vektor eignet sich aufgrund seiner geringen Größe (<3 kb) für die Analyse der TE. Nur Zellen mit einer TE von über $2 \cdot 10^6$ kolonienbildenden Einheiten pro Mikrogramm DNA ($cfu/\mu g$) wurden weiterverwendet.

TOP10-Zellen sind vom Hersteller genetisch modifiziert, so dass sie sich optimal für die Routine-Transformation von Plasmid-DNA eignen. Zu den genetischen Optimierungen gehört unter anderem eine Endonukleasedefizienz (*endA1*), welche

²⁵ Gemessen wird die zunehmende Streuung langwelligen Lichtes durch die Bakterien, wobei sichtbar trübe Lösungen um den Faktor 10 mit PBS verdünnt wurden, um aussagekräftigere Werte für die OD_{600} zu erhalten (ELBING AND BRENT, 2002). Die Wellenlänge von 600 nm bietet sich aufgrund der geringen Eigenabsorption des LB-Mediums ab dieser Wellenlänge an [vgl. Spektroskopie (rechtes Bild)].



die Qualität und Quantität während der Plasmid-DNA-Gewinnung (MiniPräp oder MaxiPräp) erhöht, sowie eine Rekombinationsdefizienz (*recA1*), welche die Stabilität des zu klonierenden DNA-Fragments garantiert.

Die Behandlung von *E. coli*-Zellen mit CaCl_2 führt zu einem Zustand der transienten Kompetenz, welche deren Fähigkeit zur Aufnahme von Fremd-DNA beschreibt (SAMBROOK, 2001). Der genaue Mechanismus, wie die Calcium-Behandlung die Kompetenz erzeugt konnte bisher nicht geklärt werden.

Zur Transformation wurden 50 μl der kompetenten *E. coli*-Zellen mit 10 μl des Ligationsansatzes bzw. 3 μl des Mutageneseansatzes (vgl. 3.2.6) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine kurzfristige Überwärmung der Zellen für 45 s bei 42 °C („Hitzeschock“) und eine erneute Abkühlung auf Eis für 2 min, während der die Aufnahme der DNA stattfand. Nachfolgend wurde den Zellen 450 μl vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium zugesetzt und diese für 1 h bei 37 °C und 300 rpm im Thermocycler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 s bei 10.000 g pelletiert. 400 μl des Überstandes wurden verworfen. Das Zellpellet wurde in dem restlichen Überstand resuspendiert und auf einer, dem Plasmid entsprechenden, antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank über Nacht.

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen

Die Gewinnung der Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse, welche 1979 von *Birnboim* und *Dolly* (BIRNBOIM AND DOLY, 1979) beschrieben wurde. Grundlage dieser Methode ist, dass sowohl die Plasmid-DNA als auch die deutlich größere genomische DNA der Bakterien bei einem pH von etwa 12 denaturieren und präzipitieren, aber nur die kleinere Plasmid-DNA nach der Neutralisierung des pH-Wertes wieder in Lösung gehen kann. 5 ml LB-Medium mit einem Antibiotikum, das der Resistenz des Plasmids entspricht, wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft („Klone picken“) und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2 ml der Kultur („Übernachtskultur“) in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß

(„E-Cup“) für 2 min bei 21.000 g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl gekühlter (4 °C) Minipräp-Lösung I resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgten der Zusatz von 200 µl raumtemperierter Minipräp-Lösung II und eine erneute Inkubation von 10 min bei RT. Schlussendlich wurden 150 µl Minipräp-Lösung III (4 °C) zugesetzt und nach 10 minütiger Inkubation auf Eis für 15 min bei 21.000 g zentrifugiert. Der Überstand (≈ 450 µl) wurde in 1,5 ml E-Cups überführt, mit 450 µl Isopropanol und 45 µl Natriumacetatlösung versetzt und bei 21.000 g für 30 min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igen Ethanol überschichtet und für 5 min bei 21.000 g zentrifugiert. Die so gereinigte DNA wurde getrocknet, bevor sie in 20 µl Reinstwasser gelöst wurde. Zur Inaktivierung etwaiger DNAsen wurde die DNA-Lösung für 10 min bei 65 °C im Thermocycler erhitzt. Die Konzentration und Reinheit²⁶ der DNA-Lösung wurde photometrisch mit Hilfe des Nanophotometers bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C. Sollten größere Mengen an Plasmid-DNA gewonnen werden, so wurden 200 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit 50 µl der Kultur für die Minipräparation beimpft und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Die größere DNA-Präparation („MaxiPräp“) erfolgte mit Hilfe des PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Reagenziensystems (Invitrogen, Darmstadt) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

3.2.3 Untersuchung isolierter Plasmid-DNA

Zur Analyse der Plasmid-DNA wurde 1 µg der DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Diese wurden zuvor aufgrund ihrer Erkennungssequenz („Schnittstellen“) so ausgewählt, dass bei der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese eine möglichst eindeutige Aussage über die Entsprechung des Plasmids mit dem im Vorhinein erdachten theoretischen Konstrukt getroffen werden konnte. DNA, welche nach der Gelelektrophorese als potentiell richtig galt, wurde zur abschließenden

²⁶ Eine Abschätzung der DNA-Reinheit ist durch die Bildung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm (A_{260}/A_{280}) möglich, da Nukleinsäuren (bedingt durch die Basen) Licht der Wellenlänge 260 nm und Proteine (bedingt durch W, Y & F) bei 280 nm UV-Licht absorbieren. Da DNA bei 280 nm nur noch etwa 55 % der Lichtenergie absorbiert, die bei 260 nm absorbiert werden, ergibt sich für eine reine DNA-Lösung ein Quotient von etwa 1,8. Bei einer reinen RNA-Lösung ergibt sich aufgrund der Hyperchromie (bedingt durch das Vorliegen als Einzelstrang) ein Quotient von etwa 2,0. Bei einer Verunreinigung mit Proteinen ist der Quotient entsprechend kleiner als 1,8 (LOTTSPICH AND ENGELS, 2006).

Überprüfung durch die Firma *GATC-Biotech* (Konstanz) mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide („Primer“) sequenziert.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA entsprechend ihrer Basenlänge („Größe“) im elektrischen Feld und wurde 1972 durch *Aaij* und *Borst* (AAIJ AND BORST, 1972) beschrieben. Eine 1%ige (*m/V*) Agarose-Lösung in TAE-Puffer Agarose wurde in der Mikrowelle aufgekocht und mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt. Die so vorbereitete Gelmatrix wurde in einer Gelgießvorrichtung samt Probentaschenkamm bei RT erstarren gelassen und danach in eine mit TAE-Puffer gefüllten horizontalen Elektrophoresekammer gegeben. Der zu untersuchenden DNA wurde der DNA-Probenpuffer zugesetzt. Nachdem die Proben sowie der DNA-Größenstandard in die Probentaschen des Gels gefüllt waren, wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V die Elektrophorese ausgeführt. Die DNA-Fragmente wurden im Geldokumentationssystem Gel IX Imager™ mittels UV-Licht dargestellt. Die Größen konnten anhand des mitgeführten DNA-Größenstandards bestimmt werden. War die Isolierung bestimmte Fragmente notwendig, so wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten. Die Abtrennung der DNA von der Agarose erfolgte nach der Freeze-Squeeze-Methode (THURING ET AL., 1975).

3.2.5 Konstruktion der verwendeten Plasmid-DNA

Sofern nicht anders angegeben, wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ein gewünschtes DNA-Fragment aus einem Plasmid geschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese von den anderen Fragmenten abgetrennt. In gleicher Weise wurde mit dem aufnehmenden Plasmid („Vektor“) verfahren, wobei entweder dieselben Restriktionsendonukleasen Anwendung fanden oder solche, die kompatible Enden zu dem zu klonierenden DNA-Fragment generierten. Sofern keine Klonierung mit überhängenden Enden der DNA („*sticky ends*“) möglich war, wurden die DNA-Überhänge mittels DNA Polymerase I (large Klenow fragment) für eine „*blunt*“-Klonierung entsprechend den Herstellervorgaben aufgefüllt oder mittels *Mung Bean Nuclease* entfernt. Für einen präparativen Schnitt wurden etwa 10 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in einem 200 µl PCR-Gefäß im

PCR-Thermocycler mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen inkubiert. Die Puffer und die Reaktionstemperatur sowie ein etwaiger Zusatz an bovinem Serumalbumin (BSA) oder S-Adenosylmethionin (SAM) wurden entsprechend dem Datenblattes des Enzyms ausgewählt. Sollte eine gleichzeitige Behandlung mit zwei Restriktionsenzymen erfolgen, so wurden die Reaktionsbedingungen dafür mit Hilfe des *Double Digest Finder* (neb.com) ausgewählt. Bestand keine Möglichkeit des Doppelverdaus, wurden die Schnitte hintereinander ausgeführt, wobei grundsätzlich mit dem Enzym begonnen wurde, welches die niedrigere Ionenkonzentration benötigte. Sofern verfügbar und der Klonierungsstrategie dienlich, wurden die HF-Enzyme (*H*igh *E*idelity) der Firma *NEB* eingesetzt, die sich durch eine verringerte, sogenannte Star-Aktivität²⁷ auszeichnen und zudem allesamt nur einen Puffer (NEB-Puffer 4) benötigen. Dies kann besonders bei Doppelrestriktionen hilfreich sein. Zur Steigerung der Spezifität während der Ligation (T4 DNA Ligase) wurde der Vektor zuvor mittels *S*hrimp *A*lkaline *P*hosphatase (SAP) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte jeweils in fünf Ansätzen, wobei die zugesetzte Menge des zu klonierenden DNA-Fragments von Ansatz zu Ansatz erhöht würde. Als Negativkontrolle wurde im ersten Ligationsansatz auf die Zugabe des zu klonierenden DNA-Fragments vollständig verzichtet.

Nachfolgend wird die Darstellung der einzelnen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte erläutert. Sofern die verwendete DNA, aber nicht deren Klonierung Teil dieser Dissertation war, weil diese schon zum Bestand des Instituts gehörte, wird dies im Folgenden mit **IB** (Institutsbestand) und gegebenenfalls einer dazugehörigen Quelle angegeben.

²⁷ Der Begriff „Staraktivität“ leitet sich aus den Publikationen ab, die beginnend mit der von Polisky et al. 1975 (POLISKY ET AL., 1975) das Phänomen beschrieben, dass Restriktionsendonukleasen unter nicht-optimalen Bedingungen eine verändert Substratspezifität (Erkennung anderer Sequenzen) aufweisen können. Die Autoren dieser ersten Studie kennzeichneten die untersuchte Restriktionsendonuklease (*EcoRI*) mit verändertem Verhalten mit einem Stern (*), um diese von *EcoRI* mit üblicher Substratspezifität zu unterscheiden (ESSER).

3.2.5.1 Klonierung von α_1 WT (human) in pFastBacTM1 | S9

Die α_1 -Untereinheit der NOsGC wurde *EcoRI/Scal* aus dem pGEM[®]-7Zf(+) Vector [von Dr. Georges Guellaën, Créteil, Frankreich (GIULI ET AL., 1992)] geschnitten und *EcoRI/StuI* in pFastBacTM1 ligiert. Abschließend wurde das Konstrukt mittels *AscI/BssHII* am 5'-Ende um einen nicht-codierenden Bereich gekürzt und religiert.

IB | Koglin et al. 2001 (KOGLIN ET AL., 2001)

3.2.5.2 Klonierung von β_1 WT (human) in pFastBacTM1 | S9

Die für die humane β_1 -Untereinheit codierende cDNA aus dem pGEM[®]-7Zf(+) Vector [ebenfalls von Dr. Georges Guellaën, Créteil, Frankreich (GIULI ET AL., 1992)] wurde *EagI/XbaI* (2.044 bp Fragment) isoliert und *NotI/XbaI* in den pFastBacTM1 Vektor kloniert.

IB | Koglin and Behrends 2000 (KOGLIN AND BEHREND, 2000)

3.2.5.3 Klonierung von $\alpha_1\Delta N_{236}$ (human) in pFastBacTM1 | S9

Die Deletion der ersten 235 Aminosäuren wurde durch die Ligation des *PvuII/HindIII*-Fragments aus dem α_1 Wildtyp (vgl. 3.2.5.1) mit dem *StuI/HindIII* geschnittenen pFastBacTM1 erreicht.

IB | Dissertation von Markus Koglin, 2002 (KOGLIN, 2002)

3.2.5.4 Klonierung von C- α_1 ($\alpha_1\Delta N_{259}$, human) in pFastBacTM1 | S9

Mit Hilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenese Reagenziensystems und den Oligonukleotiden P216/P217 wurde ein einzelnes Basenpaar im α_1 Wildtyp (vgl. 3.2.5.1) ausgetauscht, um eine Erkennungssequenz für *SpeI* zu generieren. Hiernach konnte ein *SpeI/HindIII*-Fragment isoliert werden und mit dem *SpeI/HindIII* geschnittenen pFastBacTM1 Vektor ligiert werden. Mit Hilfe dieser Strategie konnte das endogene Methionin (M259²⁸) als Startcodon erhalten werden.

IB | Koglin and Behrends 2003 (KOGLIN AND BEHREND, 2003)

²⁸ In der Aminosäuresequenz von *Rattus norvegicus* findet sich hier stattdessen ein Valin.

3.2.5.5 Klonierung von $\alpha_1\Delta N_{364}$ (human) in pFastBacTM 1 | S79

Ein *BsmFI/HindIII*-Fragment des Wildtyps (vgl. 3.2.5.1) wurde isoliert und mit Hilfe der *Taq* DNA Polymerase wurde das *BsmFI*-5'-Ende aufgefüllt, bevor es mit dem *StuI/HindIII* geschnittenen pFastBacTM 1 Vektor ligiert wurde. Diese Klonierung ist bereits beschrieben (KOGLIN AND BEHRENDTS, 2003) und stand folglich schon zu Beginn der Arbeit zur Verfügung. Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Konstrukt allerdings insofern verändert, als dass die *Kozak* Konsensus-Sequenz²⁹ (KOZAK, 1987) durch die Mutation von fünf Basenpaaren verstärkt wurde³⁰. Dazu wurde mit Hilfe der Oligonukleotide P342/P343 und dem QuikChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenese Reagenziensystem eine Mutagenese durchgeführt.

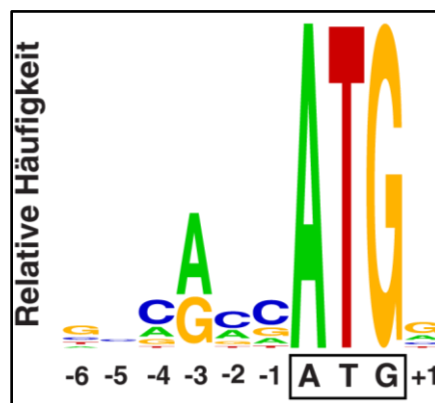
z.T. **IB** | Koglin and Behrends 2003 (KOGLIN AND BEHRENDTS, 2003)

3.2.5.6 Klonierung von α_1 -S (rat) in pFastBacTM 1 | S79

Zunächst die Beschreibung der zur Klonierung verwendeten Ausgangskonstrukte:

α_1 -EYFP in pFastBacTM 1 – Die α_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC wurde mit Hilfe der Oligonukleotide P178/P179 aus Rattenherzen amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor zwischenkloniert (BUDÄUS, 2003). Mittels *HindIII/XhoI* wurde die cDNA aus dem

²⁹ Eine 1987 durch Marilyn Kozak (KOZAK, 1987) beschriebene Sequenz, welche konserviert in der mRNA von Vertebraten vorkommt und der Nukleotidsequenz GCCRCCAUGG [R steht hier für eine Purinbase (A/G) | AUG → Startmethionin | die unterstrichenen Basenpaare gelten als die wichtigsten] entspricht. Die Sequenz spielt eine entscheidende Rolle beim Beginn der Translation.



Die Grafik wurde mit Hilfe von WebLogo (CROOKS ET AL., 2004) erstellt; einem Programm zur Erstellung von **Sequenzlogos** (SCHNEIDER AND STEPHENS, 1990), also der Darstellung relativer Häufigkeiten von Basen oder Aminosäuren. Als Datengrundlage wurden die cDNA-Sequenzen von **Kozak** verwendet (KOZAK, 1987).

³⁰ Wert steigt laut NetStart 1.0 (PEDERSEN AND NIELSEN, 1997) von 0,071 auf 0,130 (vgl. Fußnote 45).

pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor isoliert und *HindIII/SalI* in den pEYFP-N1 Vektor kloniert. Durch Restriktion mit *NheI/XbaI* gelang die Klonierung von dem pEYFP-N1 Vektor in den *SpeI/XbaI* geschnittenen pFastBac™1 Vektor (HAASE ET AL., 2010c).

β_1 -EYFP (rat) in pFastBac™1 – Die β_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC wurde mittels des Primerpaars P141/P180 aus Rattenherzen amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt wurde in den pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor kloniert (BUDÄUS, 2003), bevor es mittels *HindIII/ApaI* in den pEYFP-N1 Vektor eingebracht wurde. Durch Restriktion mit *SpeI/XbaI* wurde β_1 -EYFP aus dem pEYFP-N1 Vektor in den pFastBac™1 Vektor kloniert (HAASE ET AL., 2010c).

$\beta_1\alpha_1$ in pFastBac™1 – Die α_1 -Untereinheit der NOsGC (rat) im pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor wurde mittels PCR und dem Primerpaar P270/P269 amplifiziert, wodurch die Erkennungssequenzen für *BsrGI* (5'-Ende) und *XbaI* (3'-Ende) entstanden. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pCR®2.1-TOPO® zwischenkloniert, bevor es *BsrGI/XbaI* in den pEYFP-N1 Vektor mit β_1 -EYFP kloniert wurde, wodurch β_1 -EYFP- α_1 in pEYFP-N1 entstand. EYFP wurde durch Restriktion mit *BsrGI/ApaI* und einer Inkubation mit der Mung Bean Nuclease (→ blunt-Enden) entfernt. Das Fusionskonstrukt wurde *SpeI/NotI* in den pFastBac™1 Vektor kloniert (HAASE ET AL., 2010a).

Klonierung von α_1 -S (rat) in pFastBac™1:

Die für die 288 carboxyterminalen Aminosäuren codierende cDNA der Ratten-NOsGC Untereinheit aus dem Fusionskonstrukt ($\beta_1\alpha_1$) in pFastBac™1 (s.o.) wurde mittels des Oligonukleotidpaares P289/P290 amplifiziert, wodurch die carboxyterminale Fusion (durch den antisense-Strang) mit dem *Strep* Tag II erreicht wurde. Das PCR Produkt wurde in den pCR®2.1-TOPO® Vektor zwischenkloniert und mit *BstEII/XbaI* in $\beta_1\alpha_1$ in pFastBac™1 kloniert, wodurch der entsprechende carboxyterminale Terminus ausgetauscht wurde (→ $\beta_1\alpha_1$ -S). Durch zusätzliche Klonierung des aminoterminalen Bereichs der α_1 NOsGC Untereinheit aus pCR®2.1-TOPO® durch *SpeI/BstEII* in den obige pFastBac™1 Vektor entstand eine carboxyterminal mit *Strep* Tag II fusionierte α_1 -Untereinheit (α_1 -S), da die β_1 -Untereinheit durch die Restriktion herausgeschnitten wurden.

IB | Haase, N. et al. 2010 (HAASE ET AL., 2010a)

3.2.5.7 Klonierung von β_1 -S (rat) pFastBac™1 | S/9

EYFP aus β_1 -EYFP in pFastBac™1 (vgl. 3.2.5.6) wurde mittels *Sma*/*Pvu* mit dem *Stu*/*Pvu* Fragment aus dem Fusionskonstrukt $\beta_1\alpha_1$ -S (vgl. 3.2.5.6) im pFastBac™1 Vektor ausgetauscht.

IB | Haase, N. et al. 2010 (HAASE ET AL., 2010a)

3.2.5.8 Klonierung von α_1 -S (rat) und β_1 (human) in den pFastBac™ Dual Vektor

Mit dem Ziel größere Ausbeuten bei der Anreicherung der NOsGC-Konstrukte zu erhalten, wurde α_1 -S (rat) (vgl. 3.2.5.6) und β_1 (human) (vgl. 3.2.5.2) in den bicistronischen³¹ Vektor pFastBac™ Dual kloniert (HARRIS AND POLAYES, 1997). Aus technischen Gründen wurde zunächst die humane β_1 -Untereinheit mit *Stu*/*Xba* in die MCS I des Polyhedrin-Promoters (P_{PH}) kloniert. Nachfolgend wurde mittels *Sa*/*Xba* α_1 -S (rat) aus pFastBac™1 isoliert und *Xho*/*Nhe* in die MCS II des p10-Promoters (P_{p10}) kloniert.

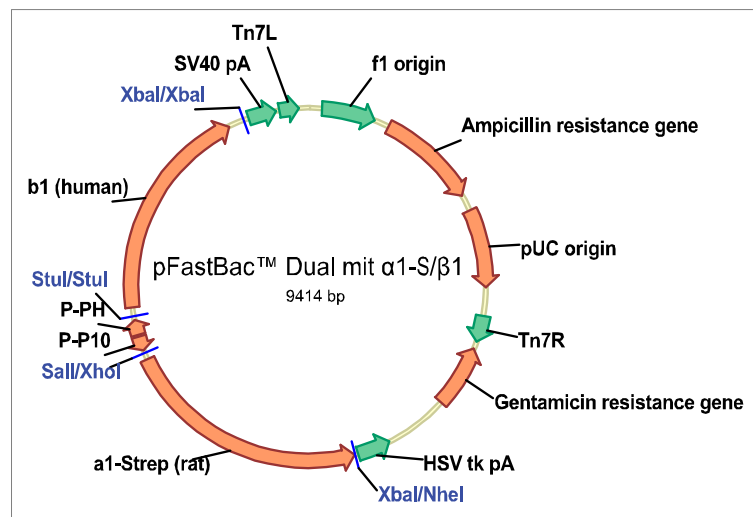


Abbildung 12

Vektorkarte des fertigen Konstrukts. α_1 -S (rat) und β_1 (human) in pFastBac™ Dual.

3.2.5.9 Klonierung von HA-CCT η in pFastBac™1 | S/9

Die cDNA, welche für die siebte (η) Untereinheit des Chaperonin Containing t-Complex Polypeptids (CCT η) fusioniert mit einem aminoterminalen HA Tag codiert, war ein Geschenk aus der Arbeitsgruppe von *Stuart Pitson* (Australien) (ZEBOL ET AL., 2009) und wurde uns im pCMV-HA Vektor zur Verfügung gestellt. Die Klonierung aus

³¹ Ein Cistron ist ein 1957 von *Seymour Benzer* eingeführter verfeinerter Begriff des Gens (BENZER, 1957). Der Begriff Cistron steht heute synonym neben dem Begriff des Gens. Bei seiner Einführung sollte er jedoch deutlich machen, dass eine nicht mehr teilbare Nukleotidsequenz gemeint sei (LEISTNER AND BRECKLE, 2000).

dem pCMV-HA Vektor in den pFastBac™1 Vektor wurde durch *StuI/NotI* (Partialverdau beim zu klonierenden DNA-Fragment) verwirklicht.

IB | Die Klonierung wurde von *Nadine Haase* ausgeführt.

3.2.5.10 Klonierung von ECFP-HA-CCT η in pFastBac™1 | S9

Für die aminoterminal Fusion von HA-CCT η (vgl. 3.2.5.9) an ECFP musste zunächst ein passender Vektor konstruiert werden, um bei der anschließenden Klonierung den Leserahmen zu erhalten. Das EGFP aus pEGFP-C2 wurde durch Restriktion mit *AgeI/BsrGI* gegen ECFP aus pECFP-C1 ausgetauscht. Dadurch entstand ein pECFP-C2 Vektor analog zum Vektor pEGFP-C2 der Firma *Clontech*. Danach konnte die cDNA für HA-CCT η aus pCMV-HA mit *Apal/BglII* isoliert werden und *Apal/BamHI* in den pECFP-C2 Vektor ligiert werden. Abschließend wurde ECFP-HA-CCT η aus pECFP-C2 mittels *NheI/XbaI* in den *SpeI/XbaI*-geöffneten pFastBac™1 Vektor kloniert.

3.2.5.11 Klonierung von $\beta_1\Delta_{H-NOX-S}$ (rat) in pFastBac™1 | S9

Die β_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC samt carboxyterminalem *Strep* Tag II (β_1 -S) aus pFastBac™1 (vgl. 3.2.5.7) wurde mit Hilfe von *BglII/HindIII* isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem durch *BglII/HindIII* partiell verdauten α_1 -S im pFastBac™1 (vgl. 3.2.5.6) ligiert, wodurch die H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit erfolgreich entfernt werden konnte.

IB | Die Klonierung wurde von *Nadine Haase* ausgeführt.

3.2.5.12 Klonierung von Fluoreszenz-markiertem α_1 WT (rat) [α_1 -XFP] | HEK

Die Klonierung der carboxyterminal mit EYFP markierten α_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC wurde schon unter 3.2.5.6 beschrieben ($\rightarrow \alpha_1$ -EYFP in pEYFP-N1). Das Konstrukt wurde auch in der Publikation von Haase, T. et al. 2010 (HAASE ET AL., 2010c) verwendet. Durch Restriktion mit *AgeI/BsrGI* wurde EYFP gegen ECFP aus pECFP-N1 ausgetauscht ($\rightarrow \alpha_1$ -ECFP in pECFP-N1).

z.T. **IB**

3.2.5.13 Klonierung von Fluoreszenz-markiertem C- α_1 ($\alpha_1\Delta N_{258}$ ³², rat) [C- α_1 -XFP] | HEK

Mit Hilfe der Oligonukleotide P338/339 und des QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenese Reagenziensystems wurde eine Mutation von fünf Basenpaaren innerhalb des Konstrukts α_1 -ECFP in pECFP-N1 (vgl. 3.2.5.12) durchgeführt. Hierdurch wurde die Erkennungssequenz für *XhoI* geschaffen, ein ATG-Startcodon (vgl. 3.2.5.4) verwirklicht sowie eine Optimierung der *Kozak* Konsensus-Sequenz (vgl. 3.2.5.5) erreicht. Nach der Mutation erfolgte eine Restriktion mit *XhoI* mit sich anschließender Religation (→ C- α_1 -CFP in pECFP-N1). Das ECFP wurde durch *AgeI/BsrGI* gegen EYFP aus pEYFP-N1 ausgetauscht (→ C- α_1 -YFP in pEYFP-N1).

3.2.5.14 Klonierung von Fluoreszenz-markiertem β_1 WT (rat) [β_1 -XFP] | HEK

Die Klonierung der carboxyterminal mit EYFP markierten β_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC wurde schon unter 3.2.5.6 beschrieben (→ β_1 -EYFP in pEYFP-N1). Durch Restriktion mit *AgeI/XbaI* wurde EYFP gegen ECFP aus pECFP-N1 ausgetauscht (→ β_1 -CFP in pECFP-N1).

IB | Haase, T. et al. 2010 (HAASE ET AL., 2010c)

3.2.5.15 Klonierung von Grx1-roGFP2 in pEGFP-N1 | HEK

Die cDNA, welche für den Redoxsensor Grx1-roGFP2 codiert, war ein Geschenk aus der Arbeitsgruppe von Tobias Dick (Heidelberg) und wurde im pLPCX Vektor zur Verfügung gestellt (GUTSCHER ET AL., 2008). Durch Restriktion mit *BglII/BsrGI* konnte die cDNA in pEGFP-N1 eingebracht werden. Durch die Wahl der Restriktionsendonukleasen wurden die für EGFP kodierenden Vektoranteile entfernt.

³² Aufgrund unterschiedlicher Aminosäuresequenzen entspricht $\alpha_1\Delta N_{258}$ der Ratte $\alpha_1\Delta N_{259}$ des Menschen (vgl. Sequenzalignment im Anhang - 7.2).

3.2.5.16 Klonierung von α_1 -Grx1-roGFP2 in pEGFP-N1 | HEK

Durch *Sma*I/*Xba*I-Restriktion von α_1 -ECFP in pECFP-N1 (vgl. 3.2.5.12) und *Eco*47III/*Xba*I-Restriktion von Grx1-roGFP2 in pLPCX (vgl. 3.2.5.15) konnte das ECFP gegen Grx1-roGFP2 ausgetauscht werden. Durch *Apa*I-Restriktion und Religation war es möglich den Leserahmen wieder herzustellen.

3.2.5.17 Klonierung von C- α_1 -Grx1-roGFP2 in pEGFP-N1 | HEK

Der Austausch von α_1 WT gegen C- α_1 gelang durch *Eco*47III/*Bst*EII-Restriktion von α_1 -Grx1-roGFP2 (vgl. 3.2.5.16) und C- α_1 -EYFP (vgl. 3.2.5.13) und Ligation der entsprechenden Fragmente.

3.2.5.18 Klonierung von ECFP-HO1 in pECFP-C1 | HEK

Die für die humane Hämoxxygenase-1 (HO1; EC 1.14.99.3) codierende cDNA wurde mit Hilfe des Primerpaares P256/P257 aus der FirstChoice™ PCR-Ready Human Placenta cDNA (Ambion, Austin, USA) gewonnen. Das so gewonnene PCR-Produkt wurde in den pCR®2.1-TOPO® Vektor zwischenkloniert, bevor mittels *Eco*RI/*Xba*I die Klonierung in den pFastBac™1 Vektor gelang. Durch Restriktion mit *Eco*RI/*Kpn*I wurde die cDNA für die HO-1 aus dem pFastBac™1 Vektor in den pECFP-C1 Vektor kloniert und entsprechend aminoterminal mit dem Fluoreszenzprotein ECFP (→ ECFP-HO1 in pECFP-C1) fusioniert.

IB | Seeanner et al. 2010 (SEEANNER ET AL., 2010)

3.2.5.19 Klonierung von α_1 (human) und β_1 -S (rat) in den pET™ Duet-1 Vektor | *E. coli* und PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Reagenziensystem

Zunächst die Beschreibung der zur Klonierung verwendeten Ausgangskonstrukte:

α_1 (human) in pcDNA3.1/V5-His-TOPO – Die für die humane α_1 -Untereinheit

codierende cDNA wurde mit Hilfe der Oligonukleotide P138/P187 und dem Template im pGEM®-7Zf(+) Vector amplifiziert. Mit Hilfe des Oligonukleotids P138 wurde beim Startcodon ATG die Erkennungssequenz für *NcoI* geschaffen. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den pcDNA3.1/V5-His-TOPO

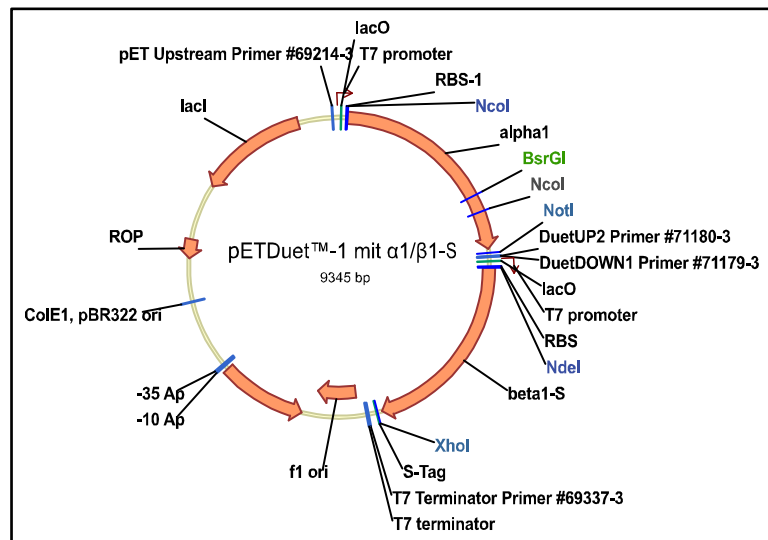


Abbildung 13

Vektorkarte des fertigen Konstrukts. α_1 (human) und β_1 -S (rat) in pETDuet™-1.

Vektor kloniert.

IB | Koglin et al. 2001 (KOGLIN ET AL., 2001)

β_1 -S (rat) in pET™-20b(+) – Eine für die Expression in *E. coli* codonoptimierte Variante der cDNA der β_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC mit carboxyterminalem *Strep* Tag II wurde als artifizielles Gen bei der Firma *Geneart* (Regensburg) bestellt (Sequenz: vgl. Anhang – 7.1). Die Firma lieferte das Gen direkt in dem gewünschten pET™-20b(+) Vektor.

Klonierung von α_1 (human) und β_1 -S (rat) in den pET™ Duet-1 Vektor:

Zunächst wurde die humane α_1 -Untereinheit in die MCS I des bicistronischen (vgl. Abbildung 13) Vektors pETDuet™-1 eingebracht. Dazu wurde α_1 im pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor einmal mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI*/*BsrGI* inkubiert, wobei ein 1.527 bp Fragment isoliert wurde, und einmal mit *BsrGI*/*NotI* behandelt, wobei ein Fragment von 586 bp isoliert werden konnte. Dieses Vorgehen war notwendig, da es auch innerhalb der α_1 Sequenz eine Erkennungssequenz für *NcoI* gibt, weshalb ohne die zusätzliche *BsrGI*-Restriktion die gewünschte Orientierung der Fragmente bei der Doppelligation in den

pET™Duet-1 Vektor über *NcoI/NotI* nicht hätte garantiert werden können (→ α_1 in pET™Duet-1). Die Klonierung von β_1 -S (rat) aus dem pET™-20b(+) Vektor in die MCS II des pET™Duet-1 Vektors wurde über *NdeI/XhoI* verwirklicht.

3.2.5.20 Klonierung von $\beta_1\alpha_1$ -S (rat) in den pET™-20b(+) Vektor | *E. coli* und PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Reagenziensystem

Mit Hilfe der Oligonukleotide P407/408 wurde über eine ortsgerichtete Mutation (vgl. 3.2.6) die Erkennungssequenz für SexAI in das artifizielle Gen (vgl. 7.1) von β_1 -S (rat) eingeführt. Diese Mutation war notwendig, da durch die für *E. coli* optimierte Sequenz die endogene SexAI-Erkennungssequenz verloren gegangen war. Nachfolgende wurde dieses Konstrukt SexAI/*XhoI* geschnitten und mit dem SexAI/*XhoI*-Fragment aus $\beta_1\alpha_1$ -S in pFastBac™1 (vgl. 3.2.5.6) ligiert.

3.2.5.21 Klonierung von α_1 (human) in den pIX4.0 Vektor | EasyXpress® Protein Synthesis Reagenziensystem

Die Klonierung erfolgte analog zu der unter 3.2.5.19 beschriebenen Strategie, in dem eine Doppelligation der beiden cDNA-Fragmente in den *NcoI/NotI* geschnittenen pIX4.0 Vektor durchgeführt wurde.

3.2.5.22 Klonierung von β_1 -S (rat) in den pIX4.0 Vektor | EasyXpress® Protein Synthesis Reagenziensystem

Die Klonierung der carboxyterminal mit dem *Strep* Tag II fusionierten β_1 -Untereinheit der Ratten-NOsGC in den pIX4.0 Vektor gelang durch die *SaII/XbaI*-Restriktion des unter 3.2.5.7 beschriebenen Konstrukts und Ligation des dabei isolierten Fragments mit dem *XhoI/Spel* geschnittenen pIX4.0 Vektor.

3.2.6 Mutationen bestimmter Nukleotide in Plasmid-DNA

Gerichtete Mutationen bestimmter Nukleotide wurden mit Hilfe des QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenese Reagenziensystems der Firma *Agilent Technologies* (Waldbronn) durchgeführt. Hierbei wird mit synthetisierten Oligonukleotiden (biomers.net, Ulm), welche die Mutationen enthalten, eine PCR durchgeführt. Der Entwurf der Oligonukleotide erfolgte unter Zuhilfenahme eines Computerprogramms, das über die Homepage der Firma *Agilent Technologies* zur Verfügung gestellt wurde. Nach der PCR liegt neben der gewünschten DNA (nicht-methyliert) mit den entsprechenden Mutationen auch noch die ursprünglich eingesetzte DNA („Wildtyp“) vor. Durch die Inkubation mit

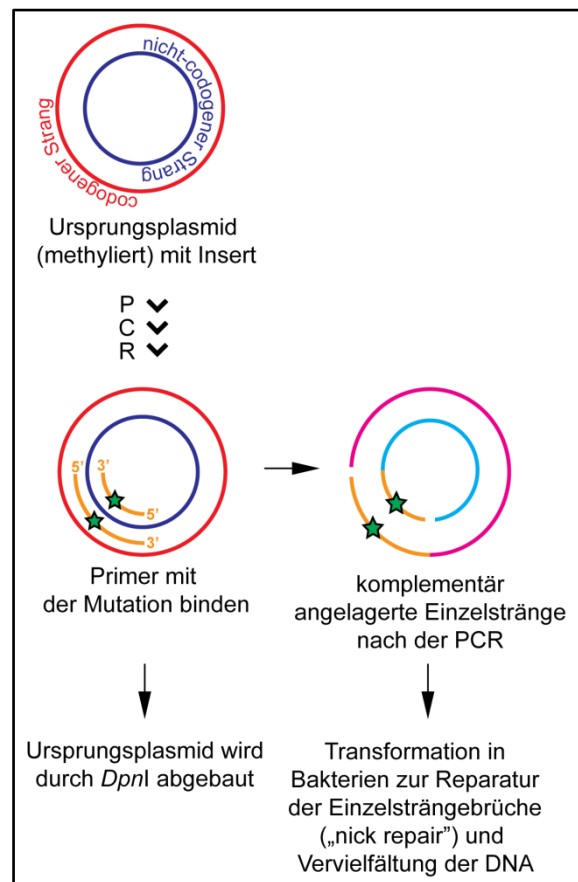


Abbildung 14

Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese

der Restriktionsendonuklease *DpnI*, welche spezifisch methylierte DNA erkennt, wurde die nicht-mutierte DNA abgebaut. Bei der Durchführung der Mutagenese wurden die Vorgaben des Herstellers beachtet. Die mutierte DNA wurde in XL10-Gold-Zellen transformiert. Nach der sich anschließenden DNA-Präparation wurde der erfolgreiche Nukleotidaustausch durch Sequenzierung (*GATC Biotech*) verifiziert.

3.2.6.1 Bildung einer inaktiven Mutante von α_1 WT (human) $\rightarrow \alpha_1$ D530A

Für die Konstruktion einer inaktiven Mutante der humanen α_1 -Untereinheit wurde die cDNA im pFastBac™1 Vektor einer Mutagenese mit den Oligonukleotiden P344/P345 (GAT:D \rightarrow GCT:A) unterzogen (wie unter 3.2.6 beschrieben). Die Mutation führt an der Stelle 530 zu einem Austausch von Asparaginsäure (D) zu Alanin (A). Dies bewirkt, dass das katalytische Zentrum der NOsGC den Cofaktor Mg^{2+} nicht mehr binden kann und damit die Fähigkeit verliert das Substrat (GTP) umzusetzen (vgl. Abbildung 8). Es resultiert ein dominant negatives Enzym (YUEN ET AL., 1994).

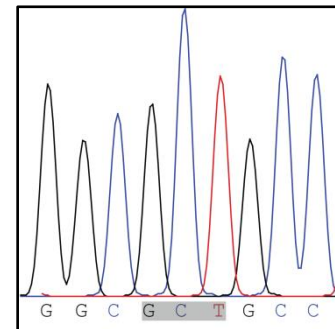


Abbildung 15
Ausschnitt aus dem
Chromatogramm der
Sequenzierung

3.2.6.2 Bildung einer inaktiven Mutante von $\alpha_1\Delta N_{259}$ (human) $\rightarrow \alpha_1\Delta N_{259}$ D530A

Die Bildung einer inaktiven Mutante von $\alpha_1\Delta N_{259}$ human wurde wie unter 3.2.6.1 beschrieben ausgeführt, da sich das Ausgangskonstrukt nur durch eine aminoternale Trunktion von 258 Aminosäuren unterscheidet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Bezeichnung D530A für die Mutation beibehalten, wenn sie auch korrekt als D272A hätte bezeichnet werden müssen.

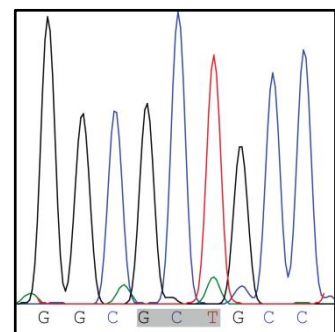


Abbildung 16
Ausschnitt aus dem
Chromatogramm der
Sequenzierung

3.2.6.3 Bildung einer hämfreien Mutante von β_1 WT (human) \rightarrow β_1 H105A

Eine hämfreie Mutante der NOsGC lässt sich durch Austausch der Aminosäure Histidin-105 (H) gegen Alanin (A) erreichen (ZHAO ET AL., 1998), da das Histidin-105 essentieller Bestandteil des Häm-Bindungsmotivs ist (SCHMIDT ET AL., 2004; SCHMIDT ET AL., 2005). Die DNA, welche für die β_1 -Untereinheit (human) codiert wurde im pFastBac™1 Vektor wie unter 3.2.6 beschrieben mit Hilfe der Oligonukleotide P329/P330 (CAC:H \rightarrow GCC:A) mutiert.

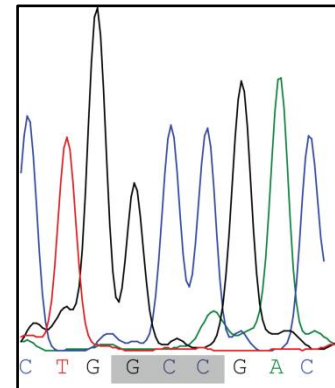


Abbildung 17
Ausschnitt aus dem
Chromatogramm der
Sequenzierung

3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur

3.3.1 Proteinexpression im Sf9/Baculovirus-Expressionssystem

Das Expressionssystem aus den Ovarialzellen des Heerwurms³³ [*Spodoptera frugiperda* (Sf9); klonale Zelllinie], einem Nachtfalter und dem Baculovirus³⁴ *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) wird seit Jahrzehnten erfolgreich zur Expression rekombinanter Proteine genutzt (VAUGHN ET AL., 1977). Sf9-Zellen vermögen als eukaryotische Zelllinie posttranslationale Modifikationen auszuführen, sind wenig scherkraftsensitiv (Schüttelkulturen möglich) und die Ausbeute ist meist deutlich höher als bei der Nutzung anderer etablierter Expressionszelllinien aus Eukaryota, wie z.B. CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*). Bei dem AcMNP-Virus handelt es sich um einen DNA-Virus mit doppelsträngiger DNA, der ein Kapsid ausbildet. Mehrere AcMNP-Viren mit Kapsid werden von einer Hülle umgeben, die ihrerseits in einer Polyhedrin-Matrix eingebettet vorliegen. Das Virus kann humane Zellen nicht infizieren (CARBONELL ET AL., 1985), wodurch eine hohe Sicherheit beim Umgang mit dem Expressionssystem gewährleistet wird. Mit einer Größe von etwa 130 kb ist das Virusgenom zu groß, um mittels Klonierung Gene zu integrieren, da es keine unikalen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen gibt, aber es enthält eine Vielzahl an repetitiven DNA-Sequenzen (LUCKOW ET AL., 1993). Daher bedient

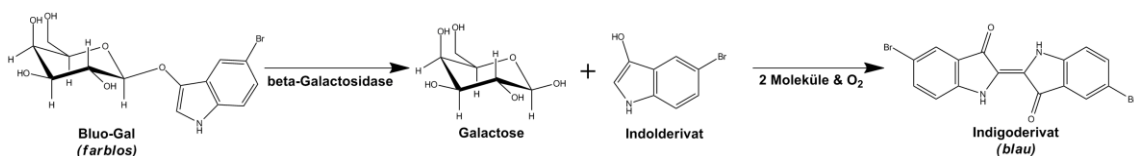
³³ Im englischen Sprachraum als „fall armyworm“ bezeichnet. Den martialischen Namen erhielt die Art, da sie in Schwärmen auftretend große landwirtschaftliche Schäden verursacht und dann als gesamtes „Heer“ zur nächsten Futterquelle weiterzieht (LUGINBILL, 1928).

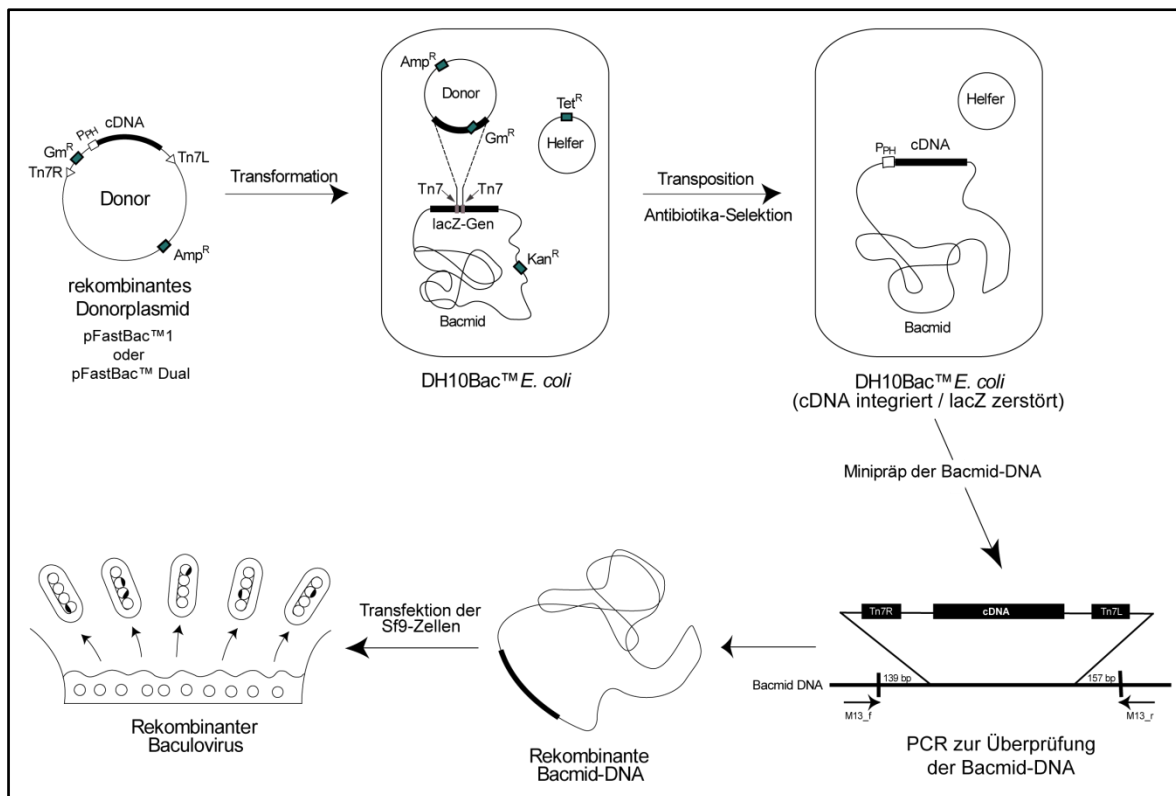
³⁴ *baculum*, lateinisch für Stab, Stock oder Zepter; bezieht sich auf die Form der Viren

man sich bei der genetischen Modifikation des Virus dem Prinzip der homologen Rekombination, bei dem die gewünschte DNA mittels *Tn7* Transposase (Nukleotidyltransferase) in nicht-essentielle Bereiche des Virusgenoms vor einem starken Promoter (meist Polyhedrin, aber auch P10) transponiert wird (BARRY, 1988). Das Virusgenom konnte isoliert werden und als modifiziertes Bacmid in *E. coli* Zellen amplifiziert werden, wodurch die Modifikation des Genoms deutlich erleichtert wurde. Die Firma *Invitrogen* bietet mit dem Bac-to-Bac[®] Expressionssystem ein vollständiges Reagenziensystem zur Expression rekombinanter Proteine in *Sf9*-Zellen an, welches auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde (vgl. Abbildung 18).

Die gewünschte cDNA wird in einen Donorvektor (pFastBac[™]1 oder pFastBac[™] Dual) kloniert und dann in MAX Efficiency[®] DH10Bac[™] *E. coli* transformiert. Der DH10Bac[™] *E. coli* Stamm enthält zum einen die Bacmid-DNA und zum anderen ein Helferplasmid, welches für die *Tn7* Transposase codiert und über ein Tetracyclin-Resistenz-Gen verfügt. Durch Transformation wird das Donorplasmid in die DH10Bac[™] *E. coli* Zellen eingebracht. Während der stattfindenden Transposition wird das lacZ-Gen des Bacmid-Genoms zerstört, so dass man auf einer Bluo-gal³⁵- und IPTG-haltigen LB-Agar-Platte mittels Blau-Weiß-Selektion Klone identifizieren kann, bei denen die Transposition erfolgt ist (lacZ⁻, also weiße Klone). Von diesen Klonen werden einige in einer Übernachtskultur vermehrt und die Bacmid-DNA mittels Minipröp isoliert. Die Bacmid-DNA wird dann mit Hilfe der Primer M13_f/M13_r durch PCR überprüft. Als korrekt identifizierte Bacmid-DNA wird in am Boden festgewachsenen und submers kultivierten *Sf9*-Zellen transfiziert, wodurch die eigentliche Virusbildung beginnt. Nach etwa fünf bis sieben Tagen lassen sich die Baculoviren isolieren.

³⁵ Bluo-Gal ist eine, um ein halogeniertes Indolderivat, erweiterte Galactose. Durch die Umsetzung mit β -Galactosidase (lacZ⁺) wird das Indolderivat frei und oxidiert mit Luftsauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff (LOTTSPREICH AND ENGELS, 2006).



**Abbildung 18**

Vorgehensweise bei der Herstellung rekombinanter Baculoviren. Erklärungen siehe Text. Modifiziert und erweitert nach der Anleitung des Herstellers (INVITROGEN, 2008). Resistenzmechanismen (POLIDORI, 2011): siehe unten stehende Tabelle.

Amp^R	β-Lactamase	Gm^R	Gentamicin-Acetyltransferase
Tet^R	Membranprotein, welches die Penetration von Tetracyclin unterbindet	Kan^R	Neomycin-Phosphotransferase

3.3.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Die Kultivierung der Sf9-Zellen erfolgte in 1 l Erlenmeyer-Flaschen aus Polycarbonat mit Belüftungsdeckel (Fa. Corning) bei 27 °C und 140 rpm in einem Schüttler der Firma New Brunswick. Die Zellen wurden, sofern nichts anderes angegeben wurde, in Sf-900II™ SFM Medium (Invitrogen) unter Zusatz von 10 % (V/V) fetalem Rinderserum (PAA) und 1 % (V/V) des gebrauchsfertigen Antibiotikagemisches 100-fach Penicillin/Streptomycin (PAA) inkubiert. Die so resultierenden Antibiotikakonzentrationen liegen beim Penicillin bei 100 U/ml und für Streptomycin 100 µg/ml. Unter diesen gewählten Bedingungen konnte eine Verdopplung der Zelldichte alle 18 – 24 h beobachtet werden, so dass die Zellen etwa alle drei Tage passagiert werden mussten, um eine Zelldichte von über $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml zu

vermeiden. Alle drei Monate wurden die Zellen verworfen und gegen Zellen mit einer kleineren Anzahl an Passagen ausgetauscht (aus den Dauerkulturen bei -150 °C).

3.3.1.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Transposition der Konstrukte aus dem Transfektor pFastBac™1 bzw. pFastBac™ Dual in das Baculovirus-Genom

Nach Abschluss erfolgreicher Klonierungen in einem der beiden Donorvektoren (pFastBac™1 oder pFastBac™ Dual) erfolgte die Transformation dieser Plasmid-DNA in die DH10Bac™ *E. coli* Zellen mit dem Ziel, in diesen eine Transposition der betreffenden cDNA in das Baculovirus-Genom zu erreichen. Das Vorgehen entsprach weitestgehend dem der Transformation in *E. coli*-Zellen des Subtyps DH5 (vgl. 3.2.1) mit dem Unterschied, dass die Zellen nach dem „Hitzeschock“ und der Zugabe des SOC-Mediums für 3 h bei 37 °C im Thermomixer inkubiert wurden. Danach erfolgte der Ausstrich der Zellen auf LB-Agar-Platten, denen Gentamicin (7 µg/ml), Tetracyclin (50 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), IPTG und Bluo-Gal zugesetzt worden war. Nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C wurden weiße Klone ausgewählt und für die Minipräp (vgl. 3.2.2) vorbereitet. Die gewonnene Bacmid-DNA wurde mittels PCR daraufhin überprüft, ob die cDNA in das Virusgenom transponiert wurde (vgl. 3.3.1).

Transfektion der Sf9-Zellen

Die Transfektion der Sf9-Zellen mit der Bacmid-DNA erfolgte in 6-Loch-Platten (Greiner Bio-One). Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/Vertiefung mit 2 ml Sf-900™II SFM Medium (serum- und antibiotikahaltig) für 1 h bei 27 °C inkubiert, so dass die Zellen am Boden festwachsen konnten. Währenddessen wurde 1 µg der Bacmid-DNA zur Transfektion vorbereitet, indem die DNA in 100 µl serum- und antibiotikafreiem Sf-900™II SFM Medium aufgenommen wurde. Gleichzeitig wurden 4 µl Cellfectin® II in 100 µl des gleichen Mediums verdünnt. Diese beiden Ansätze wurden nach einer einstündigen Inkubation bei RT vereinigt und mit 800 µl Medium (wie schon zuvor) versetzt und dann den Zellen in den Vertiefungen zugesetzt. Das serum- und antibiotikahaltige

Medium auf den Zellen wurde zuvor entfernt. Nach einer Einwirkzeit von 5 h wurde die Transfektionsmischung entfernt und gegen das serum- und antibiotikahaltige Medium ersetzt. Nach fünf Tagen (27 °C) wurden der Überstand mitsamt den Zellen genutzt, um eine Amplifikation der Viren anzusetzen.

Amplifikation der rekombinanten Viren

Die Amplifikationen der Viren erfolgten üblicherweise in 200 ml Ansätzen bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen/ml in 1 l Erlenmeyer-Kolben. Dem Ansatz wurde bei der ersten Amplifikation der komplette Inhalt der Zellkulturschale zugesetzt bzw. bei weiteren Amplifikationen 1 ml der Virussuspension. Täglich wurde den Amplifikationsansätzen ein kleines Aliquot entnommen und mit Hilfe von Trypanblau unter dem Lichtmikroskop auf Vitalität untersucht. Bei einer Vitalität unter 40 % (meist innerhalb von einer Woche) wurde der Ansatz in 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 4.000 g zentrifugiert, bevor der Virusüberstand sterilfiltriert (0,2 µm) wurde. Die Lagerung der Viren erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter wurde mit Hilfe der 2009 beschriebenen Sf9 Easy Titer-Zelllinie (Sf9ET) bestimmt (HOPKINS AND ESPOSITO, 2009). Die Zellen wurden über das nationale Gesundheitsinstitut der Vereinigten Staaten [National Institutes of Health (NIH), Rockville, USA] bezogen. Die Sf9ET-Zellen sind stabil, in Gegenwart von Geneticin (G-418), mit einem Plasmid transfiziert, welches für GFP codiert und dessen Expression unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters steht. Somit eignen sich diese Zellen zur Bestimmung des Virustiters, da ihre GFP-Expression und damit das detektierbare Fluoreszenzlicht proportional zur Viruskonzentration ist. Die Sf9ET-Zellen wurden im Sf-900™II SFM Medium mit Serum und Antibiotika (wie Sf9-Zellen) unter Zusatz von Geneticin (1,5 mg/ml) kultiviert.

Auf einer für Fluoreszenzmessungen geeigneten 96-Loch-Platte wurden pro Vertiefungen 100 µl Sf9ET-Zellen mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Diese wurden mit 10 µl einer Verdünnung des Virus (10^{-4} bis 10^{-9}) infiziert (vgl. Abbildung 19) und nach einer siebentägigen Inkubation bei 27 °C im Fluoreszenz-Plattenleser vermessen. Eine Fluoreszenzintensität die doppelt so hoch war wie die mitgeführten Kontrollen, wurde als positiv gewertet.

A1 Medium +FBS +Pen/ Strep	A2 Medium +FBS +Pen/ Strep	A3 Medium +FBS +Pen/ Strep	A4 Medium +FBS +Pen/ Strep	A5 Medium +FBS +Pen/ Strep	A6 Medium +FBS +Pen/ Strept	A7 Medium +FBS +Pen/ Strep	A8 Medium +FBS +Pen/ Strep	A9 Medium +FBS +Pen/ Strep	A10 Medium +FBS +Pen/ Strep	A11 Medium +FBS +Pen/ Strep	A12 Medium +FBS +Pen/ Strep
B1 Medium +FBS +Pen/ Strep	B2 10 ⁻⁴	B3 10 ⁻⁴	B4 10 ⁻⁴	B5 10 ⁻⁴	B6 10 ⁻⁴	B7 10 ⁻⁴	B8 10 ⁻⁴	B9 10 ⁻⁴	B10 Kontrolle	B11 Kontrolle	B12 Medium +FBS +Pen/ Strep
C1 Medium +FBS +Pen/ Strep	C2 10 ⁻⁵	C3 10 ⁻⁵	C4 10 ⁻⁵	C5 10 ⁻⁵	C6 10 ⁻⁵	C7 10 ⁻⁵	C8 10 ⁻⁵	C9 10 ⁻⁵	C10 Kontrolle	C11 Kontrolle	C12 Medium +FBS +Pen/ Strep
D1 Medium +FBS +Pen/ Strep	D2 10 ⁻⁶	D3 10 ⁻⁶	D4 10 ⁻⁶	D5 10 ⁻⁶	D6 10 ⁻⁶	D7 10 ⁻⁶	D8 10 ⁻⁶	D9 10 ⁻⁶	D10 Kontrolle	D11 Kontrolle	D12 Medium +FBS +Pen/ Strep
E1 Medium +FBS +Pen/ Strep	E2 10 ⁻⁷	E3 10 ⁻⁷	E4 10 ⁻⁷	E5 10 ⁻⁷	E6 10 ⁻⁷	E7 10 ⁻⁷	E8 10 ⁻⁷	E9 10 ⁻⁷	E10 Kontrolle	E11 Kontrolle	E12 Medium +FBS +Pen/ Strep
F1 Medium +FBS +Pen/ Strep	F2 10 ⁻⁸	F3 10 ⁻⁸	F4 10 ⁻⁸	F5 10 ⁻⁸	F6 10 ⁻⁸	F7 10 ⁻⁸	F8 10 ⁻⁸	F9 10 ⁻⁸	F10 Kontrolle	F11 Kontrolle	F12 Medium +FBS +Pen/ Strep
G1 Medium +FBS +Pen/ Strep	G2 10 ⁻⁹	G3 10 ⁻⁹	G4 10 ⁻⁹	G5 10 ⁻⁹	G6 10 ⁻⁹	G7 10 ⁻⁹	G8 10 ⁻⁹	G9 10 ⁻⁹	G10 Kontrolle	G11 Kontrolle	G12 Medium +FBS +Pen/ Strep
H1 Medium +FBS +Pen/ Strep	H2 Medium +FBS +Pen/ Strep	H3 Medium +FBS +Pen/ Strep	H4 Medium +FBS +Pen/ Strep	H5 Medium +FBS +Pen/ Strep	H6 Medium +FBS +Pen/ Strep	H7 Medium +FBS +Pen/ Strep	H8 Medium +FBS +Pen/ Strep	H Medium +FBS +Pen/ Strep	H10 Medium +FBS +Pen/ Strep	H11 Medium +FBS +Pen/ Strep	H12 Medium +FBS +Pen/ Strep

Abbildung 19

Schema zur Belegung der 96-Loch-Mikrotiterplatte.

Die nachfolgende Auswertung beruht auf der Berechnung derjenigen Viruskonzentration, bei der 50 % der Kultur (TCID₅₀) infiziert würden (REED AND MUENCH, 1938). Weiterführende theoretische und statistische Grundlagen zu dieser Methode finden sich bei *Dougherty* (DOUGHERTY, 1964) sowie *Hughes und Wood* (HUGHES AND WOOD, 1986). Der TCID₅₀ und der daraus resultierende pfu-Wert errechnen sich folgendermaßen:

Tabelle 1

Formeln zur Bestimmung des Virustiters.

$PD = \frac{A_{\%} - 50}{A_{\%} - B_{\%}}$	<p>PD = proportionale Distanz des 50 %-Signals zum Signal bei Verdünnung A</p> <p>A% = Prozentsatz der Vertiefungen mit infizierten Zellen mit der Virusverdünnung, die ein Infektiösität über 50 % bewirkt</p> <p>B% = Prozentsatz der Vertiefungen mit infizierten Zellen mit der Virusverdünnung, die ein Infektiösität unter 50 % bewirkt</p>
$\lg(TCID_{50}) = V(A_{Exp}) - PD$ \Leftrightarrow $TCID_{50} = 10^{\lg(TCID_{50})}$	<p>V(A_{Exp}) = Exponent der Virusverdünnung A</p>
$\frac{pfu}{ml} = \frac{1}{TCID_{50}} \times 0,69 \times 100$	<p>pfu = plaque forming unit</p> <p>Der Faktor 100 ergibt sich aus den eingesetztem Volumen von 10 µl Virusverdünnung, da er angibt mit welcher Zahl multipliziert werden müsste, um 1 ml (1.000 µl) zu erreichen.</p>

Die für die Zellkultur gebräuchliche MOI (*multiplicity of infection*) beschreibt das Verhältnis der Viruspartikel (pfu) pro Zielzelle.

3.3.1.3 Infektion von Sf9-Zellen zur Herstellung von rekombinantem Protein

Zur Infektion der Sf9-Zellen wurden diese zuvor auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einem Erlenmeyerkolben verdünnt und dann mit einem Volumen der Virussuspension infiziert, welches einer MOI von 1 entsprach. Es wurde darauf geachtet, dass der Erlenmeyerkolben fünfmal so groß war, wie die Kultur, um eine gute Sauerstoffzufuhr zu garantieren. Nach einer Inkubation von 72 h bei 27 °C und 140 rpm konnten die Zellen geerntet werden, indem sie bei 4 °C für 1 min bei 4.000 g pelletiert wurden.

3.3.2 Proteinexpression in HEK-293 Zellen

3.3.2.1 Kultivierung von HEK-293 Zellen

HEK-293 Zellen leiten sich von humanen embryonalen Nierenzellen³⁶ (*human embryonic kidney*) ab und wurden Ende der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts durch adenovirale Transformation immortalisiert (GRAHAM ET AL., 1977). Die Zellen wurden in phenolrotfreiem D-MEM (High Glucose) mit Zusatz von 10 % (V/V) FBS und 1 % (V/V) des Antibiotikagemisches aus Penicillin (resultierend 100 U/ml) und Streptomycin (resultierend 100 µg/ml) bei 37 °C und 5%iger (V/V) CO₂-Sättigung kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen mittels Trypsinisierung passagiert.

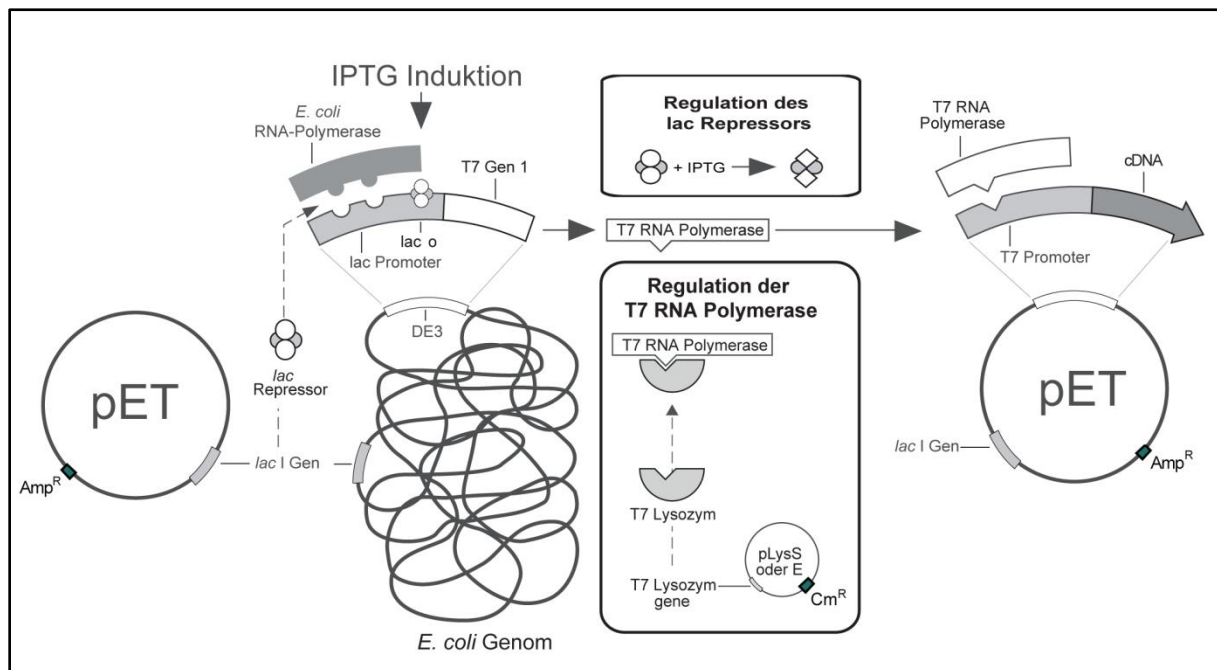
3.3.2.2 Transfektion von HEK-293 Zellen

Die HEK-293 Zellen wurden je nach Bedarf in 6-Loch- oder 24-Loch-Platten ausgesät und für mindestens einen Tag darin kultiviert, um den Zellen die Möglichkeit zur Adhäsion zu gewähren. Die Zelldichte wurde so gewählt, dass am Tag der Transfektion die Zellen konfluent waren und somit die Transfektionseffizienz am größten war. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine™ LTX (Invitrogen) verwendet, bei dem zusätzlich ein Plus-Reagenz (Invitrogen) zur Anwendung kommt. Bei einer 24-Loch-Platte wurden je Plasmid 0,5 µg DNA in 50 µl serum- und antibiotikafreiem D-MEM (High Glucose) Medium aufgenommen und mit 0,5 µl des Plus-Reagenz gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 1,5 µl Lipofectamin™ LTX zugesetzt und erneut bei RT für 30 min inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 48stündiger Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Zellen verwendet werden.

³⁶ Es gibt Hinweise darauf, dass es sich bei HEK-293 Zellen um eine neuronale Zelllinie handeln könnte. So konnten beispielsweise Hogan et al. (HOGAN ET AL., 2004) mittels Western-Blot-Analyse zeigen, dass HEK-293 Zellen N-Cadherin (an Zell-Zell-Kontakten beteiligtes Protein) exprimieren, einem typischerweise in Neuronen anzutreffenden Protein. Auch eigene Western-Blot-Analysen mit dem anti-N-Cadherin-Antikörper, welchen auch Hogan et al. in ihrer Arbeit verwendeten, erhärten diese Vermutung (Daten nicht gezeigt). Gerry Shaw, Professor für Anatomie und Zellbiologie der University Florida (Gainesville, USA), hat eine Datenbank (SHAW) initiiert, in der er Belege für den neuronalen Ursprung von HEK-293 Zellen gesammelt hat (SHAW ET AL., 2002).

3.3.3 Proteinexpression in *E. coli* des Stamms BL21(DE3)pLysS

Zur Expression der NOsGC-Konstrukte in *E. coli* wurde das pET-System (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*) der Firma Novagen mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet. Das System fußt auf der Expressionskontrolle durch die T7 RNA Polymerase und wurde in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt (STUDIER AND MOFFATT, 1986). Der T7-Promoter entstammt einer Bakteriophage und kann somit nicht durch die *E. coli*-eigene RNA Polymerase erkannt werden. Die Expression der T7 RNA Polymerase wird durch einen lac-Operator kontrolliert, so dass die Expression dieser Polymerase reguliert werden kann. Die Regulation der Expression wird im pET-System durch mehrere Instanzen kontrolliert. So codiert das Genom des BL21(DE3)pLysS-Stammes für den lac-Repressor, welcher die Expression der T7 RNA Polymerase unterbindet. Einige Expressionsvektoren, wie auch der in dieser Arbeit verwendete pET™Duet-1, codieren ihrerseits für den lac-Repressor, welcher den inhibitorischen Effekt verstärkt. Zusätzlich enthalten die *E. coli*-Zellen des verwendeten Stammes ein Helferplasmid [Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R)], welches für das T7 Lysozym codiert, einem natürlichen Inhibitor der T7 RNA Polymerase. Dies ist in doppelter Weise hilfreich, da zum einen auch in der Gegenwart des lac-Repressors immer eine kleine Menge an T7 RNA Polymerase gebildet wird („leakiness“) und außerdem der Aufschluss der Zellen, durch die kontinuierlich zunehmende Konzentration an T7 Lysozym (spaltet das Peptidoglykan der bakteriellen Zellwand) erleichtert wird. Diese restriktive Kontrolle der Expression des eigentlichen Proteins dient dazu, eine optimale Ausbeute zu erzielen, da diese gezielt induziert wird, wenn die gewünschte Zelldichte im Kulturvolumen erreicht ist. Die induzierte Expression ist dann so stark, dass die Zellen nahezu alle vorhandenen Ressourcen in das gewünschte Protein umsetzen. Die Induktion wird durch ein schwefelhaltiges Galactosederivat (IPTG) induziert, welches durch die Bindung an den lac-Repressor eine Konformationsänderung bewirkt, so dass er seine Repressorfähigkeit einbüßt. Der Vorteil dieses Galactose-Derivates ist, dass es im Gegensatz zum natürlichen Induktor Lactose (Disaccharid aus Glucose und Galactose) nicht verstoffwechselt werden kann.

**Abbildung 20**

Prinzip des pET-Systems. Erklärungen siehe Text. Modifiziert und erweitert nach der Anleitung des Herstellers (NOVAGEN, 2010). Resistenzmechanismen: siehe unten stehende Tabelle.

Amp^R	β-Lactamase	Cm^R	Chloramphenicol-Acetyltransferase
------------------------	-------------	-----------------------	-----------------------------------

Zur Expression der NOsGC wurden zunächst die unter 3.2.5.19 und 3.2.5.20 beschriebenen Konstrukte wie unter 3.2.1 dargestellt in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert und auf einer Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen. Eine einzelne Kolonie wurde dann in 250 ml TB-Medium (50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) gegeben und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 bei 37 °C und 250 rpm kultiviert, bevor durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG die Induktion erfolgte. Nach einer Stunde wurde 0,4 mM 5-Aminolävulinsäure zugesetzt, welche als Intermediat des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Hämsynthese die Hämhaltigkeit des Enzyms steigern sollte. Nach 12stündiger Inkubation bei 37 °C und 250 rpm wurden die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert (10 min bei 15.000 g).

3.3.4 Proteinexpression in zellfreien *in vitro* Systemen

3.3.4.1 PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Reagenziensystem

Zur Expression von Proteinen in dem PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Reagenziensystem wurde dem Protokoll des Herstellers *New England Biolabs* (Frankfurt am Main) gefolgt und als Templates die unter 3.2.5.19 und 3.2.5.20 beschriebenen Konstrukte verwendet. Das Reagenziensystem besteht ausschließlich aus rekombinant hergestellten Proteinen, die für die Proteinbiosynthese notwendig sind, so dass alle enthaltenden Komponenten genau definiert sind. Auf dem von der Firma beigefügten Kontrollplasmid, wird die cDNA für die Dihydrofolat-Reduktase (NCBI Referenz: NP_752010.1) aus *E. coli* codiert (SASSE). Das Enzym ist mit 204 Aminosäuren relativ klein, weshalb es recht schnell exprimiert werden kann und entspringt dem Organismus (*E. coli*) auf dessen Transkriptions-/Translationssystem das PURExpress® basiert (SHIMIZU ET AL., 2001; SHIMIZU ET AL., 2005). Die besondere Eignung des Enzyms besteht darin, dass es sich, ebenso wie die von *Anfinsen* untersuchte Ribonuklease (ANFINSEN ET AL., 1954), spontan zu falten vermag (HOHFELD AND HARTL, 1994; ROSPERT ET AL., 1996).

3.3.4.2 EasyXpress® Protein Synthesis Reagenziensystem

Für die Proteinexpression im EasyXpress® Protein Synthesis Reagenziensystem wurde nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) vorgegangen. Als Templates dienten die *blunt*-linearisierten (*Sma*I) Konstrukte im zum Reagenziensystem gehörenden pIX4.0 Vektor, wie sie unter 3.2.5.21 und 3.2.5.22 beschrieben sind.

3.3.5 Gewinnung der rekombinant exprimierten Proteine

3.3.5.1 Gewinnung der rekombinant exprimierten Proteine aus S9-Zellen

Die – wie unter 3.3.1.3 beschrieben – gewonnenen Zellpellets aus 500 ml Zellkulturvolumen wurden in 30 ml Lysispuffer resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall (4 Zyklen à 16 s bei 50%iger Intensität) aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde mittels Lichtmikroskop unter Trypanblau-Zusatz kontrolliert. Für die

Anreinigung wurde nach erfolgreichem Aufschluss 250 nM Avidin zugesetzt, um verbliebenes Biotin aus dem Kulturmedium (IBA, 2010) zu binden, da es die Anreinigung über *Strep*-Tactin stören würde. Die Suspension wurde für 30 min bei 4 °C unter ständigem Rühren inkubiert, um die quantitative Avidin-Biotin-Komplexierung zu gewährleisten. Im Anschluss daran erfolgte die Zentrifugation bei 15.000 g für 180 min bei 4 °C. Um verbliebene Partikel abzutrennen und um die cytosolische Fraktion für die chromatographische Anreinigung vorzubereiten, wurde diese mittels 0,2 µm Spritzenaufsatzfilter filtriert.

3.3.5.2 Gewinnung der rekombinant exprimierten Proteine aus *E. coli*

Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des BugBuster® Protein Extraktion Reagenz (Merck), wobei dem *E. coli*-Sediment aus 10 ml Kulturvolumen 500 µl des Reagenz zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert wurde. Dann erfolgte der Zusatz von PIC (1 Tablette pro 500 ml Zellkulturvolumen) und 250 nM Avidin. Die Suspension wurde für 30 min bei 4 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Die Abtrennung des Cytosols von den Zellresten erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C für 2 h bei 15.000 g. Zur Vorbereitung für die chromatographische Anreinigung wurde das Cytosol mit Hilfe eines 0,2 µm Spritzenaufsatzfilters filtriert.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Nanophotometers basierend auf der Warburg-Christian-Methode (WARBURG AND CHRISTIAN, 1941) bestimmt. Die Methode beruht auf der Absorptionsmessung von Proteinen bei 280 nm, wobei die Kontamination mit Nukleinsäuren (A_{260}) berücksichtigt wird.

$$c = (1,55 \cdot A_{280}) - (0,76 \cdot A_{260})$$

3.5 Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation basiert auf der Eigenschaft von Protein A, spezifisch den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden. Das Protein wurde ursprünglich aus *Staphylococcus aureus* isoliert (BJORCK AND KRONVALL, 1984). Zur Immunpräzipitation wurden cytosolische Fraktionen aus infizierten Sf9-Zellen

Material und Methoden

verwendet, wie unter 3.3.5.1 beschrieben mit dem Unterschied, dass statt des Lysispuffers (TEA-Puffer) der PBS-Lysispuffer verwendet wurde. Je 1.500 µg Gesamtprotein des Sf9-Cytosols wurde mit einem 10 mg Aliquot Protein A Sepharose für 2 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert, um unspezifisch bindende Fraktionen aus dem Cytosol zu entfernen. Nach der Abtrennung der Sepharosebeads³⁷ wurde der Antikörper zugesetzt, mit dem die Präzipitation erfolgen sollte. Für die

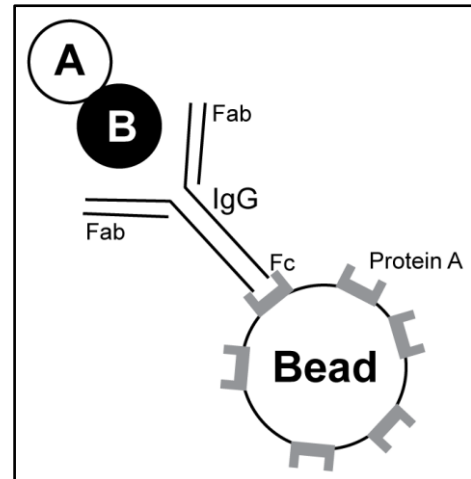


Abbildung 21

Prinzip der Immunpräzipitation. A: Interaktionspartner des bekannten Proteins B.

Antikörper-Antigen-Bindung wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert, um eine möglichst quantitative Bindung zu garantieren. Am nächsten Morgen wurde ein 20 mg Aliquot der Protein A Sepharose zugesetzt und für 2 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (200 g bei 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Protein A Sepharosebeads dreimal mit dem PBS-Lysispuffer und einmal mit dem IP-Waschpuffer gewaschen. Zur Dissoziation des Komplexes wurde dieser in 75 µl 2-fach Probenpuffer suspendiert und für 3 min bei 105 °C (120 °C Deckelhitze) im Thermocycler erhitzt, bevor 2 µl des Blaupuffers zugesetzt wurden. Dieser Ansatz wurde für 1 min bei 21.000 g zentrifugiert und dann wie unter 3.7.3 beschrieben mittels SDS-PAGE analysiert. Nach der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe konnte mit Hilfe geeigneter Antikörper überprüft werden, ob eine entsprechende Proteininteraktion nachweisbar war.

³⁷ *bead*; engl. für Perle
(Langenscheidt Online-Wörterbücher, Großwörterbuch Englisch, 2011)

3.6 Anreinigung rekombinanter Proteine

3.6.1 Affinitätschromatographie mittels *Strep*-Tactin – Ein-Schritt-Reinigung

Die Anreinigung von mit dem *Strep* Tag II fusionierten, Proteinen basiert auf einer biotechnologisch optimierten Interaktion zwischen dem *Strep* Tag II und dem dazu

passenden Säulenmaterial, dem *Strep*-Tactin® (vgl. Strukturdaten: PDB 1RSU), welches auf der natürlichen Bindung zwischen Biotin und Avidin beruht. Die Nutzung des *Strep* Tag II bietet einen akzeptablen Kompromiss bezüglich der Reinheit des Proteins und den dabei entstehenden Kosten

(LICHTY ET AL., 2005). Der *Strep* Tag II besteht aus dem

Oktapeptid »WSHPQFEK«. Die Glutaminsäure an der Position 7 ist essentiell für die ionische Wechselwirkung mit dem *Strep*-Tactin® (SCHMIDT ET AL., 1996). Das *Strep*-Tactin® ist ein auf die Erkennung des *Strep* Tag II optimiertes Streptavidin, welches ursprünglich aus einer Streptomycesart gewonnen wurde (SCHMIDT AND SKERRA, 2007; IBA, 2010). Die Elution des Zielproteins erfolgt durch D-Desthiobiotin, welches aufgrund des fehlenden Schwefelatoms weniger oxidationsempfindlich ist als natives D-Biotin und eine schwächere Bindung mit dem *Strep*-Tactin® eingeht, so dass das Säulenmaterial durch den Einsatz des Azofarbstoffes HABA regenerierbar ist und somit mehrfach verwendet werden kann. Ein besonderer Nachteil des ansonsten häufig eingesetzten Hexahistidin Tags bei der Anreinigung der NOsGC ist das zur Elution notwendige Imidazol, welches jedoch zur Interaktion mit Häm neigt und somit zu einem Verlust des Cofaktors (prothetische Gruppe) der NOsGC führen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit fiel die Entscheidung daher zugunsten des Einsatzes des *Strep* Tag II aus. Aus der Literatur war bekannt, dass der Zusatz von 1 M NaCl die NOsGC-Stabilität begünstigt (OHLSTEIN ET AL., 1982; STONE AND

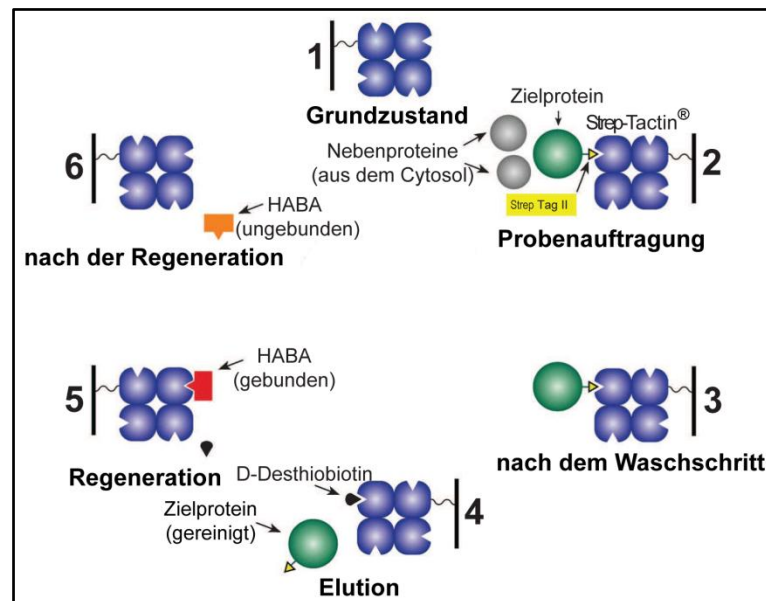


Abbildung 22

Prinzip der Anreinigung mittels *Strep* Tag II (modifiziert nach SCHMIDT AND SKERRA, 2007).

MARLETTA, 1994), weshalb sowohl dem *Strep* Wasch-, als auch dem *Strep* Elutionspuffer je 1 M NaCl zugesetzt wurden. Diese Erfahrung steht im Kontrast zu der Annahme, dass bei sehr hohen Salzkonzentrationen die thermodynamische Stabilität von Proteinen abnimmt, da es zu einer Abschirmung des ausgeprägten Dipolmoments der Peptidbindung (partiell positive geladener Stickstoff und partiell negativ geladener Sauerstoff der Carboxylgruppe) kommt (CHI ET AL., 2003). In dem Wissen, dass supraphysiologische Osmolaritäten [> 300 mosmol/l (THEWS ET AL., 1999)] die Aktivität der NOsGC beeinflussen, wurde das Enzym für die Bestimmung der katalytischen Aktivität hinreichend verdünnt.

Die Proteinchromatographie wurde mit Hilfe eines ÄKTA Purifier 100 durchgeführt. Die Flussrate betrug in allen chromatographischen Schritten 1 ml/min. Das gewonnene Cytosol (wie unter 3.3.5.1 beschrieben) wurde auf 2 ml des *Strep*-Tactin[®] Superflow[®] high capacity Säulenmaterials aufgetragen, welches zuvor in eine Tricorn[™] 10/20 Säule (GE Healthcare, München) gegossen und mit 10 Säulenvolumina *Strep* Waschpuffer äquilibriert wurde. Nach der Probenauftragung wurden die Säulen mit 10 Säulenvolumina *Strep* Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Danach erfolgte die Elution mit 5 Säulenvolumina des *Strep* Elutionspuffers. Die Fraktionen während des Elutionsschrittes wurden in 0,5 ml großen Aliquots gesammelt. Fraktionen bei denen eine Absorption bei 280 nm detektiert werden konnte (etwa 8 ml), wurden anschließend vereinigt und mit Hilfe von Zentrifugationsfiltern [Amicon Ultra, 15 ml, 30 kDa (Millipore, Schwalbach) auf ein Volumen von etwa 500 µl reduziert. Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde die Säule zunächst mit 15 Säulenvolumina des *Strep* Regenerationspuffers behandelt, bevor ein Waschschrift mit dem *Strep* Waschpuffer für 20 Säulenvolumina folgte.

3.6.2 Affinitätschromatographie mittels Anti-HA Affinity Matrix

Die Anreinigung der mit dem HA-Tag fusionierten Proteine (vgl. 3.2.5.9) erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekularmasse in einem Gel aus Acrylamid. Dies ist sowohl als vorbereitender Schritt für den Western-Blot³⁸ notwendig als auch für die Durchführung einer Coomassie-Blau-Färbung direkt im Acrylamid-Gel. In dieser Arbeit wurde ein 6%iges Sammelgel und ein 8 %iges Trenngel verwendet. Die selbstgegossenen Gele wurden in die vertikale Gelelektrophoreskammer Mini-PROTEAN eingesetzt und mit 1-fach SDS-Laufpuffer (1 Teil des unter 3.1.3 beschriebenen 10-fach Puffers mit 9 Teilen Reinstwasser) gefüllt, so dass die Gele überschichtet waren. Im Allgemeinen wurden 50 µg Gesamtprotein bei der Analyse von Cytosolen und 1 µg der angereinigten Proteine verwendet. Die Proteine wurden für die SDS-PAGE vorbereitet, indem sie mit dem 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt wurden und nachfolgend für 3 min bei 105 °C (120 °C Deckelhitze) im Thermocycler gekocht wurden, um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten. Um die Pipettierung in dem transparenten SDS-Gel zu erleichtern, wurden den Proben abschließend 2 µl des SDS-Blaupuffers zugesetzt. Als Größenstandard wurden sowohl ein vorgefärbter als auch ein ungefärbter Marker genutzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromspannung zwischen 80 und 120 Volt bei konstanter Stromstärke für 1,5 bis 4 h durchgeführt.

³⁸ *blot*; engl. für (Farb-, Tinten-) Klecks
(Langenscheidt Online-Wörterbücher, Großwörterbuch Englisch, 2011)

3.7.1 Coomassie-Färbung

Gele der SDS-PAGE, welche für die Anfärbung mittels Coomassie-Blau vorgesehen waren, wurden zunächst zweimal für 10 min in Reinstwasser gewaschen, um das im Gel gebundenen SDS weitestgehend abzureichern, da es während der Färbung für einen deutlich gefärbten Hintergrund sorgen würde. Die gewaschenen Gele wurden mit der Coomassie Färbelösung überschichtet und über Nacht bei RT unter kontinuierlichem Schütteln (Taumelschüttler) gefärbt. Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes wurden die Gele nach dem Färbeprozess für etwa 6 h mit der Coomassie Entfärbelösung behandelt (Bedingungen wie zuvor). Die hier verwendete, sogenannte kolloidale Coomassie-Färbung ist eine bezüglich ihrer Sensitivität weiterentwickelte Variante (KANG ET AL., 2002) der seit Jahrzehnten genutzten Anfärbung von Proteinen mittels Coomassie-Blau (FAZEKAS DE ST GROTH ET AL., 1963). Die Bindung des anionischen Farbstoffes beruht auf einer unspezifischen Interaktionen mit den basischen (kationisch) und apolaren Aminosäuren des Proteins (LOTTSPICH AND ENGELS, 2006).

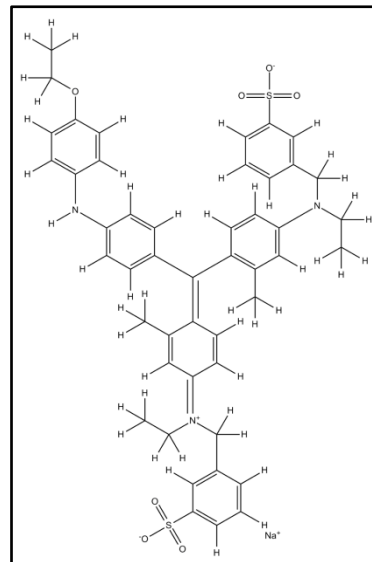


Abbildung 23
Strukturformel von
Coomassie-Brillant-Blau
G-250

3.7.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach *Heukeshoven* und *Dernick* (HEUKESHOVEN AND DERNICK, 1985) wurde mit Hilfe des Silberfärb-Reagneziensystem der Firma *GE Healthcare* entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Das Prinzip der Silberfärbung beruht auf der Komplexbildung von Ag⁺-Ionen mit den Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystein. Durch die Zugabe alkalischer Formaldehydlösung werden die Silberionen reduziert und führen so zu der charakteristischen braunen bis schwarzen Färbung. Die genauen Einzelheiten der Reaktion sind aber bis heute unbekannt. Der Methode wird eine sehr hohe

Sensitivität zugesprochen, da die Nachweisgrenze bei etwa 50 pg Protein liegt (REHM AND LETZEL, 2009).

3.7.3 Western-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der Proteine mittels Immunoblot wurden die Proteine aus den Gelen mittels SemiDry-Blotter auf Nitrocellulose transferiert („geblottet“) (TOWBIN ET AL., 1979). Dazu wurden die Gele auf die Nitrocellulosemembran gelegt, wobei Lufteinschlüsse vermieden wurden. Nachfolgend wurden die Gele mit Filterpapieren abgedeckt und mit 1-fach Transferpuffer (1 Teil des unter 3.1.3 beschriebenen 10-fach Puffers mit 9 Teilen Reinstwasser) überschichtet. Der Transfer erfolgte durch Anlegen einer Stromstärke von etwa 3 mA je Quadratzentimeter

SDS-Gel/Nitrocellulose, wobei die Stromspannung konstant gehalten wurde. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Nitrocellulosemembranen nach dem

Blot-Vorgang mit Hilfe der Ponceau S Färbelösung reversibel angefärbt. Außerdem ermöglichte die

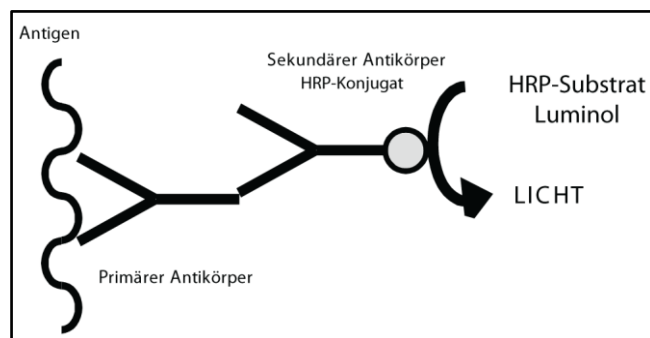


Abbildung 24

Prinzip der Western-Blot-Analyse bei Nutzung der Chemilumineszenz (modifiziert nach ROCHEAPPLIEDSCIENCE, 2006).

Ponceau S Färbung die Sichtbarmachung des ungefärbten Proteinstandards, welche so mit Hilfe eines Kugelschreibers nachgezeichnet werden konnte, um auch nach der Inkubation mit den Antikörpern noch erkennbar zu sein. Durch einstündige Behandlung auf einem Taumelschüttler bei RT mit einer 5%igen (*m/V*) Milchpulverlösung in 1-fach TBST (Verdünnung des 10-fach Puffers wie zuvor) oder über Nacht im Kühlschrank, konnte das Ponceau S entfernt werden, wobei gleichzeitig unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt wurden. Nachfolgend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper bei RT. Die Verdünnung des Primärantikörpers orientierte sich an den Datenblättern des jeweiligen Herstellers. Zur Entfernung der ungebundenen Fraktion des Primärantikörpers folgte dreimaliges Waschen der Membranen mit 1-fach TBST für jeweils 5 min, bevor der Sekundärantikörper 1 h bei RT zugesetzt wurde. Der

Sekundärantikörper richtet sich mit seinem F_{ab}-Teil gegen den F_c-Teil des primären Antikörpers und ist über den F_c-Teil mit der Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) fusioniert, welche Luminol in einer Chemilumineszens-Reaktion umzusetzen vermag. Im Anschluss an die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, mit 1-fach TBST gewaschen bevor durch Zusatz des HRP-Substrats die Detektion in der ECL Dokumentationsanlage erfolgte.

3.8 Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität

Der 1984 von *Schultz und Böhme* (SCHULTZ AND BÖHME, 1984) beschriebene Assay für die Bestimmung der Enzymaktivität der NOsGC beruht auf dem Nachweis von [³²P]cGMP, welches aus [α -³²P]GTP gebildet wird. Cytosolische Fraktionen wurden auf eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/µl und angereinigtes Enzym auf eine Konzentration von 2,5 ng/µl mit Lysispuffer verdünnt. Den Verdünnungen des angereinigten Enzyms wurde BSA in einer Konzentration 0,5 µg/µl zugesetzt, um die Adsorption des Enzyms an den Wänden der Reaktionsgefäße möglichst zu unterbinden. Je Probe wurden 20 µl der Enzymverdünnungen (\triangleq 50 µg der cytosolischen Fraktionen oder 50 ng des angereinigten Enzyms) eingesetzt und mit einem Reaktionsgemisch aus 1 mM [³¹P]cGMP, 0,5 mM [α -³¹P]GTP und [α -³²P]GTP (\approx 0,2 µCi \triangleq 7.400 Bq), 3 mM MgCl₂ oder MnCl₂, 3 mM DTT, 1 mM IBMX, 5 mM Creatinphosphat, 0,25 mg/ml (\approx 35 U/ml) Creatinkinase und 50 mM TEA (pH 7,4) zu einem Gesamtvolumen von 100 µl ergänzt. MnCl₂ wurde für Proben gewählt, die nur basale Aktivität zeigten, da Mn²⁺-Ionen diese erhöht. Je nach Anzahl der Modulatoren wurde die Konzentration des Mastermix angepasst. Die unter 3.1.2 beschriebenen Stammlösungen wurden jeweils soweit verdünnt, dass die DMSO-Konzentration 2,5 % (V/V) nicht überschritt, da bis zu dieser Konzentration keinerlei Einfluss durch das Lösemittel gezeigt werden konnte. Unmittelbar nach der Zugabe des Mastermix wurden die Proben für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl 120 mM Zinkacetat und 500 µl 120 mM Natriumcarbonat (\rightarrow ZnCO₃ ↓) gestoppt, währenddessen das nicht umgesetzte GTP copräzipitiert wurde (CHAN AND LIN, 1974). Die Proben wurden für 8 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (900 µl) wurde auf durch 2 ml 0,1 M Perchlorsäure angesäuerte Aluminiumoxidsäulen gegeben und

nachfolgend mit 10 ml Reinstwasser gewaschen. Unter sauren Bedingungen sind die Leerwerte niedriger (JAKOBS ET AL., 1976). Diese Aluminiumoxidchromatographie diente dem Abtrennen von nicht-umgesetztem GTP (WHITE, 1974). Das an dem Aluminiumoxid gebundene cGMP konnte dann durch Zugabe von 5 ml 250 mM Natriumacetat (pH 6,5) in Szintillationsgefäße eluiert werden.

Die im Mastermix enthaltenen Komponenten erfüllen verschiedene Funktionen. DTT dient als Antioxidans, welches das Häm-Eisen im zweiwertigen Zustand stabilisieren soll. IBMX ist ein Inhibitor der Phosphodiesterasen und unterbindet somit einen Abbau von cGMP. Der Zusatz von nicht-radioaktiv markiertem [^{31}P]cGMP erhöht die Wiederfindungsrate für das [^{32}P]cGMP und dient als zusätzlicher Schutz des markierten [^{32}P]cGMP vor der Degradation durch Phosphodiesterasen. Die Kombination aus Creatinkinase und Creatinphosphat bildet ein regenerierendes System für durch GTPasen abgebautes GTP. Der Zusatz von nicht-radioaktiv markiertem [α - ^{31}P]GTP dient dazu, das markierte [α - ^{32}P]GTP vor dem Abbau durch GTPasen zu schützen.

Phosphor-32³⁹ zerfällt aufgrund eines Neutronenüberschusses, mit einer Halbwertszeit von etwa 14 Tagen in Schwefel-32 unter Freisetzung von β^- -Strahlung (Elektronen). Der Nachweis der β^- -Strahlung erfolgt im Flüssigkeitsszintillationszähler durch die Messung der Lichtintensität, welche durch den Čerenkov-Effekt⁴⁰ (ČERENKOV, 1934) entsteht und wird in Zerfällen pro Minute ausgegeben.

Bei jeder Aktivitätsbestimmung wurden vier Proben mitgeführt, denen kein Enzym zugesetzt wurde, so dass eine Bestimmung des Leerwertes möglich war, da auch

³⁹ $^{32}_{15}\text{P}_{17} \rightarrow ^{32}_{16}\text{S}_{16} + e^- (+\text{Antineutrino}) \quad | \quad \left(\begin{array}{c} \text{Nukleonenanzahl} \\ \text{Protonenanzahl (=OZ)} \end{array} \right) \text{Radionuklid} \left(\begin{array}{c} \text{Protonenanzahl (=OZ)} \\ \text{Neutronenanzahl} \end{array} \right)$

⁴⁰ Die Elektronen, welche beim radioaktiven Zerfall frei werden, polarisieren beim Durchtritt die Teilchen der Flüssigkeit. Die Rückführung der Polarisation (Wiedereinnahme des Grundzustandes) erfolgt unter Aussendung von Licht [etwa 3.300 Photonen je Elektron (STEINER)]. Da die Elektronen schneller durch das Medium wandern als es Licht in diesem kann, bleibt die gegenseitige Auslöschung der Lichtquanten aus und das Licht kann als proportionales Maß für den radioaktiven Zerfall bestimmt werden. Čerenkov-Strahlung tritt bei β^- -Strahlern mit einer Energie von etwa 263 keV auf, weshalb sich ^{32}P (1,71 MeV) mittels des Čerenkov-Effektes nachweisen lässt. Das durch den Čerenkov-Effekt entstehende Licht ist abhängig von der Teilchenenergie sowie dem Medium und strahlt im UV/Vis-Spektrum (300 - 700 nm), wobei das Maximum für ^{32}P bei etwa 420 nm liegt (EDLER, 2004). Zur Messung wurden Szintillationsvials aus Polyethylen verwendet, da hiermit größere Lichtausbeuten detektiert werden können (KELLOGG, 1983).

Material und Methoden

nicht-enzymatisch cGMP aus GTP gebildet werden kann (KIMURA AND MURAD, 1974b). Zu Beginn der Arbeit wurde die Wiederfindungsrate des [^{32}P]cGMP bestimmt, indem das [α - ^{32}P]GTP durch [^{32}P]cGMP ersetzt wurde. Dies war notwendig, da während der ZnCO_3 -Präzipitation unweigerlich auch ein Teil cGMP copräzipitiert, dessen Anteil bei Nichtbeachtung eine geringere Enzymaktivität vermuten ließe. Die Gegenüberstellung von eingesetzter zu isolierter Aktivität ergab eine Wiederfindungsrate für das [^{32}P]cGMP von $0,5 \pm 0,05$. Die Radionuklidreinheit⁴¹ von [α - ^{32}P]GTP wird vom Hersteller mit über 90 % angegeben. Mit Kenntnis dieser Variablen (Leerwert, Wiederfindungsrate und Radionuklidreinheit) und der eingesetzten Enzymmenge kann man aus den Zerfällen pro Minute die enzymatische Aktivität des Enzyms berechnen und diese in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ angeben (s.u.).

Zur Auswertung wurden einerseits nur Messwerte verwendet, die mindestens doppelt so hoch waren wie der Leerwert (C_0). Um eine vollständige Substratsättigung des Enzyms zu garantieren, wurden andererseits Messwerte verworfen, bei denen die Anzahl der radioaktiven Zerfälle je Ansatz (C_t) größer als 10% der eingesetzten Radioaktivität war.

$v = \frac{(C - C_0)}{C_t} \cdot \frac{S}{W \cdot R \cdot P \cdot t}$	<p>v = Spezifische Aktivität der NOsGC [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]</p> <p>$C$ = Zerfälle pro Minute der Probe</p> <p>C_0 = Zerfälle pro Minute des Leerwerts</p> <p>C_t = Zerfälle pro Minute des eingesetzten [α-^{32}P]GTP je Ansatz</p> <p>W = Wiederfindungsrate des [^{32}P]cGMP</p> <p>R = Radionuklidreinheit des [α-^{32}P]GTP</p> <p>P = Proteinmenge [mg]</p> <p>t = Inkubationsdauer [min]</p>
---	---

⁴¹ Verhältnis der Aktivität des betreffenden Radionuklids zur gesamten Aktivität.

3.9 Bestimmung der Größe von Proteinen mittels Gelfiltration

Zur Bestimmung der Größe von Proteinen wurde eine kalibrierte Gelfiltrationssäule verwendet. Als Säule diente HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg (GE Healthcare), welche mit Hilfe des Gel Filtration HMW Calibration Reagenziensystems (GE Healthcare) kalibriert wurde. Die Kalibration wurde an einem ÄKTA Purifier (GE Healthcare) ausgeführt. Das Prinzip der Kalibration beruht darauf, dass mindestens dreimal Proteine definierte Größe und Blue Dextran 2000 (zur Bestimmung des Totvolumens) über die Gelfiltrationssäule aufgetrennt werden. Mit Hilfe der dabei bestimmten Elutionsvolumina kann der Verteilungskoeffizient K_{AV} bestimmt werden.

$$K_{AV} = \frac{\text{Elutionsvolumen x des Proteins} - \text{Totvolumen (Blue Dextran 2000)}}{\text{Volumen des Säulenbetts} - \text{Totvolumen (Blue Dextran 2000)}}$$

Trägt man K_{AV} linear auf die Ordinate und die Proteingröße auf die Abszisse dekadisch-logarithmisch auf, ergibt sich eine Gerade. Die Funktion dieser Gerade kann dann bei Proteinen unbekannter Größe genutzt werden, um deren Größe zu ermitteln.

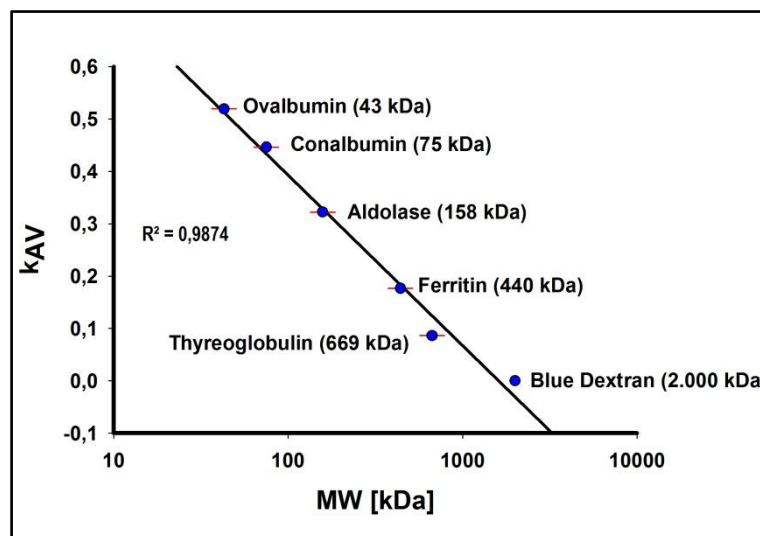


Abbildung 25

Ermittelte **Standardgerade** für die Gelfiltrationssäule (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg).

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Kalibration ergab folgende Funktion zur Beschreibung der Geraden.

$$\text{kDa} = \frac{e^{(K_{AV}-1,0446)}}{-0,142}$$

3.10 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Mikroskopie ist seit ihrer Einführung durch *Leeuwenhoek* eine der bedeutsamsten Methoden in den Lebenswissenschaften, da sie den am stärksten ausgeprägten Sinn des Menschen, die visuelle Wahrnehmung anspricht (YUSTE, 2005). Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Variation der Lichtmikroskopie, welche auf dem Prinzip beruht, die Strukturen von Interesse mit einem Fluorophor zu versehen oder deren endogene Fluoreszenz zu nutzen und so eine Diskriminierung zwischen dem zu Untersuchenden und seiner Umgebung zu erzielen. Mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (TSIEN, 1998) wurde die Fluoreszenzmikroskopie revolutioniert (YUSTE, 2005), da es damit möglich wurde beliebige Proteine, mittels gentechnischer Methoden, mit einem Fluorophor zu fusionieren. Das grün fluoreszierende Protein wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und lässt sich aufgrund seiner Größe von etwa 27 kDa leicht mit anderen Proteinen fusionieren. Im Laufe der vergangenen Jahre wurde durch die Einführung gezielter Mutationen im GFP (z.B. CFP oder YFP) eine ganze Farbpalette geschaffen. Strukturell ähneln die fluoreszierenden Proteine einem Zylinder in dessen Zentrum sich nach der Translation und Faltung durch Sauerstoffeinfluss ein Fluorophor ausbildet („Reifung“). Für die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins wurde im Jahr 2008 der Nobelpreis für Chemie *Martin Chalfie*, *Osamu Shimomura* und *Roger Y. Tsien* zuerkannt.

3.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der klassischen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie überlagern sich die Fluoreszenzsignale aus den verschiedenen z-Ebenen. Dies führt zu einer reduzierten Auflösung. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie erreicht durch eine rasterartige Fluoreszenzanregung mittels eines Lasers und die alleinige Detektion des Lichtes aus einer z-Ebene dieses Problem. Zur Untersuchung der subzellulären

Lokalisation und zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit wurden HEK-239 Zellen in 24-Loch-Platten mit der entsprechenden cDNA wie unter 3.3.2.2 beschrieben transfiziert und für 48 h kultiviert (vgl. 3.3.2.1). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ (Inkubationskammer der Firma *Okolab*, Neapel, I) am Nikon A1 Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung (Öl-Immersion, NA 1.4. Objektiv der Firma *Nikon*) aufgenommen. Da die Zellen schon während der Transfektion in phenolrotfreiem Medium inkubiert wurden, konnte der sonst übliche Waschschrift mit HBSS zur Reduzierung des Hintergrundes entfallen. Das cyan fluoreszierende Protein (ECFP) wurde mit einem Argon-Laser (CVI Melles Griot, Bensheim) bei 457 nm angeregt und mit Hilfe eines Bandpassfilters bei 482 nm ($\pm 17,5$ nm) aufgenommen. Das gelb fluoreszierende Protein (EYFP) wurde ebenfalls mit einem Argon-Laser der Firma *CVI Melles Griot* angeregt (514 nm), wobei die Aufnahme bei 540 nm (± 15 nm) mit einem Bandpassfilter erfolgte. Die Auflösung der Bilder entsprach 512 · 512 Pixel (x- und y-Ebene) und erreichte eine optische Schichtdicke von 350 bis 700 nm (z-Ebene).

3.12 Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit mittels *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*

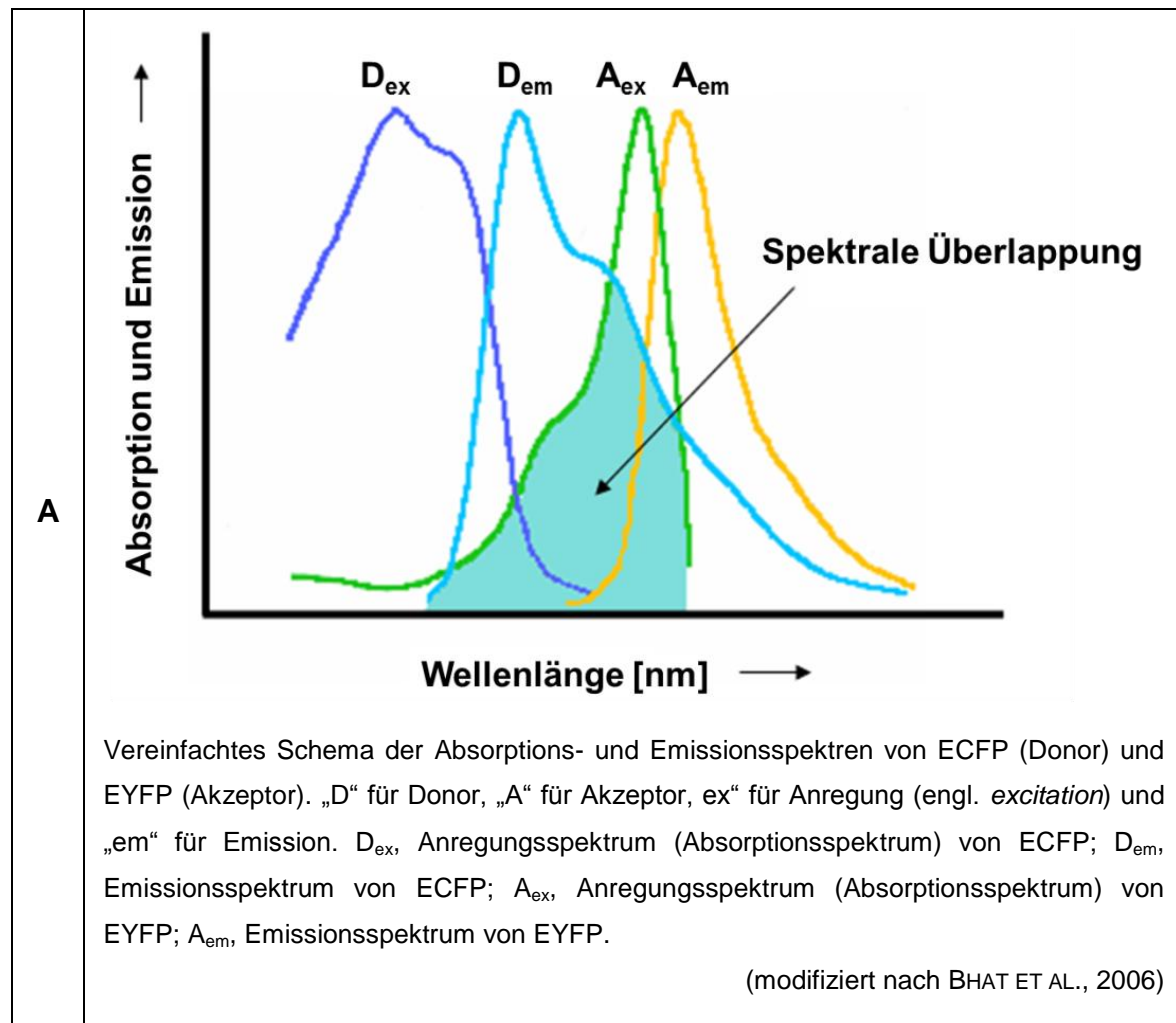
Die Messung der Reduktion der Fluoreszenzlebenszeit ermöglicht es Interaktionen, wie z.B. eine Dimerisierung, zwischen Proteinen nachzuweisen. Das der Methode zugrunde liegende Prinzip ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), welcher 1948 durch Förster beschrieben wurde (FÖRSTER, 1948). Regt man ein Fluoreszenzprotein an (Donor, z.B. ECFP), dessen Emissionsspektrum im Anregungsspektrum eines zweiten Fluoreszenzproteins (Akzeptors, z.B. EYFP) liegt (Tabelle 2A), kann man durch Messung der Fluoreszenzlebenszeit des Donors eine Interaktionen zwischen diesen beiden Proteinen nachweisen, da FRET nur bis zu einer Distanz von 80 Å auftritt (TRUONG AND IKURA, 2001).

Die Fluoreszenzlebenszeit des Donors wird durch die Anwesenheit eines Akzeptors bei einer Distanz von unter 80 Å reduziert, da es zu einer strahlungslosen⁴² Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor kommt (Tabelle 2B). Somit steht dem Donor weniger Energie für die eigene Fluoreszenz zur Verfügung und damit verkürzt sich die Zeit in der er Fluoreszenzlicht abstrahlen kann. Die Behandlung der HEK-293 Zellen bis zur Vermessung am A1 Laser-Scanning-Mikroskop erfolgte bei den gleichen Bedingungen wie unter 3.11 beschrieben. Die Bilder wurden mit Hilfe eines gepulsten Lasers (405 nm) und eines ECFP-Bandfilters (475 ± 10 nm) aufgenommen, wobei die Abnahme der Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Vier-Kanal-Detektions-System (LiMo Modul, Nikon; Messung der Intensität erfolgte zu vier Zeitpunkten) aufgenommen wurde (Tabelle 2C). Die Auflösung der Bilder betrug $256 \cdot 256$ Pixel. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit eines Interaktionspartners, wurde ECFP alleine transfiziert.

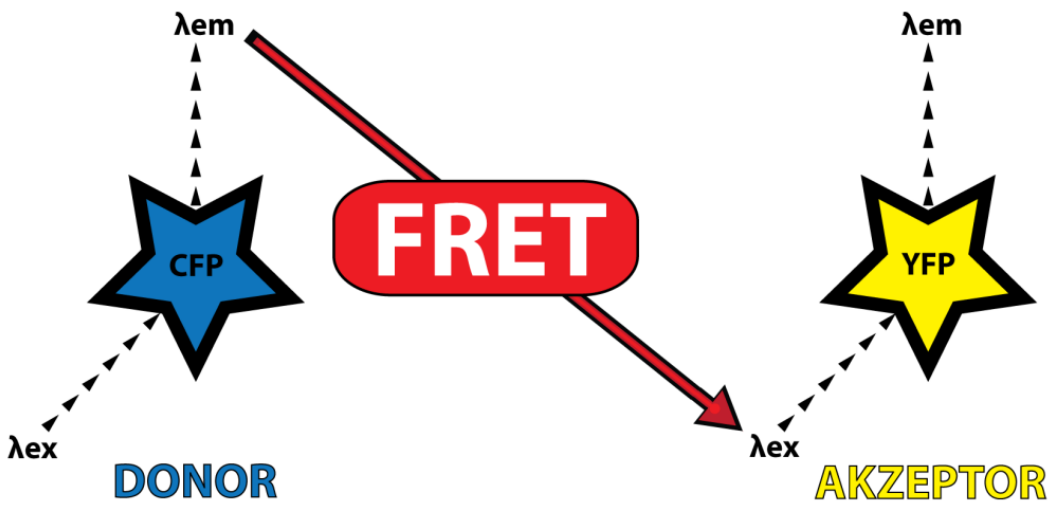
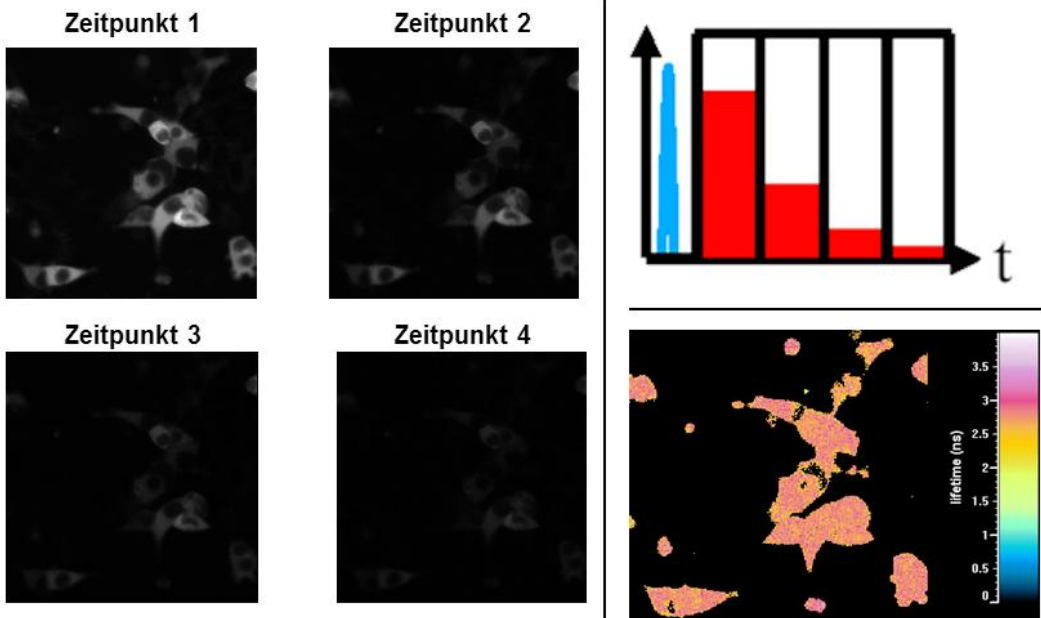
⁴² Strahlungslose Energieübertragung beschreibt, dass keine Energieübertragung durch das Fluoreszenzlicht (Licht ist eine Strahlung) stattfindet, sondern es sich um einen quantenmechanischen Effekt handelt, bei dem ein Donormolekül Licht absorbiert und dabei in einen höheren Energiezustand übergeht. Bevor es in seinen Grundzustand fällt kommt es zu einer über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermittelten Übertragung von Energie auf das Akzeptormolekül (CARDULLO, 2007).

Tabelle 2

Prinzip der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit



(Fortsetzung der Tabelle 2)

B	 <p>(KRAEHLING ET AL., 2010)</p> <p>Visualisierung des Prinzips des Fluoreszenz-Energie-Resonanz-Transfers.</p>
C	 <p>(BALZAR; KRAEHLING ET AL., 2010)</p> <p>Dargestellt ist die praktische Umsetzung der Fluoreszenzlebenszeit-Messung. Im linken Bildteil sind die Aufnahmen von Zellen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (Abstand: 2 ns) dargestellt. Daraus ergibt sich die Abklingkurve des Fluoreszenzlichts (rechts oben). Das zum Mikroskop gehörende Computerprogramm errechnet ein Falschfarbenbild mit der Angabe der Fluoreszenzlebenszeit (rechts unten).</p>

3.13 Statistische Auswertung

Die ermittelten Messdaten sind als Mittelwert \pm ihres Standardfehlers bezogen auf den Mittelwert von n unabhängigen Experimenten angegeben. Signifikanzen zwischen verschiedenen Datensätzen wurden mit Hilfe des t-Tests nach *Student*⁴³ (STUDENT, 1908) ermittelt. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

⁴³ *Student* war das von *William Sealy Gosset* benutzte Pseudonym, da sein Arbeitgeber, den Angestellten aus Angst vor Geheimnisverrat verboten hatte zu publizieren (PEARSON ET AL., 1990).

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens einer Spleißvariante der α_1 -Untereinheit der NOsGC

4.1.1 Identifizierung der durch das C- α_1 - und C*- α_1 -Transkript gebildete α_1 -Form der NOsGC

Zunächst wurden die drei, von der Arbeitsgruppe um *Ferid Murad* beschriebenen (SHARINA ET AL., 2008), Transkripte hinsichtlich ihrer ORFs (> 1.000 bp) analysiert, wobei der Wildtyp (Y15723) erwartungsgemäß einen ORF von 2.070 bp aufwies, welche für die 690 Aminosäuren der *full-length*⁴⁴ α_1 -Untereinheit codieren. Sowohl das C- α_1 - als auch das C*- α_1 -Transkript enthalten einen 1.365 bp großen ORF, welcher jeweils für 455 Aminosäuren der α_1 -Untereinheit codieren. Fertigt man ein Alignment der drei, durch den jeweiligen ORF, codierten Aminosäuresequenzen mit Hilfe des ClustalW2-Programms an, erkennt man, dass die beiden Transkripte C- α_1 (AK226125) und C*- α_1 (BX649180) für die selbe Aminosäuresequenz codieren. Dies haben bereits *Sharina* et al. (SHARINA ET AL., 2008) beschrieben. Allerdings wird deutlich, dass das C- α_1 -Protein eine nur um 235 Aminosäuren ($\alpha_1\Delta N_{236}$) verkürzte Variante darstellt (Tabelle 3B) und nicht wie von den Autoren angenommen, um 240 Aminosäuren verkürzt ist. In einem 2011 veröffentlichten Review haben die Autoren die Korrektur der Nummerierung auf unsere Anregung hin übernommen (SHARINA ET AL., 2011).

⁴⁴ *full-length*; engl. in voller Größe, lebensgroß; häufig im Zusammenhang mit der Beschreibung von verkürzten Varianten eines Proteins gebraucht; hier Synonym zu Wildtyp gebraucht (Langenscheidt Online-Wörterbücher, Großwörterbuch Englisch, 2011)

Tabelle 3

Auszüge aus dem **Alignment** der drei **Transkripte** (α_1 -WT, Y15723; C- α_1 , AK226125; C*- α_1 , BX649180) (Zeile A) sowie der durch diese codierte **Aminosäuresequenzen** (Zeile B). Die Startmethionine sind fett markiert und grau hinterlegt.

A				ATG 1
	α_1 -WT	(496)	TCGCAGCAGGGTAAGAGACACCAACACC	ATG TTCTGCACGAAGCTCAAGG
	C*- α_1	(276)	TCGCAGCAGGGTAAGAGACACCAACACC	ATGTTCTGCACGAAGCTCAAGG
	C- α_1	(167)	-----	-----
	α_1 -WT	(546)	ATCTCAAGATCACAGGAGAGTGTCTTTCTCCTTACTGGCACCAGGTCAA	
	C*- α_1	(326)	ATCTCAAGATCACAGGAGAGTGTCTTTCTCCTTACTGGCACCAGGTCAA	
	C- α_1	(167)	-----	-----GTCAA
	α_1 -WT	(596)	GTTCTTAACGAGTCTTCAGAGGAGGCAGCAGGAAGCTCAGAGAGCTGCAA	
	C*- α_1	(376)	GTTCTTAACGAGTCTTCAGAGGAGGCAGCAGGAAGCTCAGAGAGCTGCAA	
	C- α_1	(172)	GTTCTTAACGAGTCTTCAGAGGAGGCAGCAGGAAGCTCAGAGAGCTGCAA	
	α_1 -WT	(646)	AGCAACCGTGCCCATCTGTCAAGACATTCTGAGAAGAACATACAAGAAA	
	C*- α_1	(426)	AGCAACCGTGCCCATCTGTCAAGACATTCTGAGAAGAACATACAAGAAA	
	C- α_1	(222)	AGCAACCGTGCCCATCTGTCAAGACATTCTGAGAAGAACATACAAGAAA	
	α_1 -WT	(696)	GTCTTCTCAAAGAAAAACCAGTCGGAGCCGAGTCTATCTTCACACTTTG	
	C*- α_1	(476)	GTCTTCTCAAAGAAAAACCAGTCGGAGCCGAGTCTATCTTCACACTTTG	
	C- α_1	(272)	GTCTTCTCAAAGAAAAACCAGTCGGAGCCGAGTCTATCTTCACACTTTG	
	α_1 -WT	(746)	GCAGAGAGTATTTGCAAACCTGATTTTCCCAGAGTTTGAACGGCTGAATGT	
	C*- α_1	(526)	GCAGAGAGTATTTGCAAACCTGATTTTCCCAGAGTTTGAACGGCTGAATGT	
	C- α_1	(322)	GCAGAGAGTATTTGCAAACCTGATTTTCCCAGAGTTTGAACGGCTGAATGT	
	α_1 -WT	(796)	TGCACTTCAGAGAACATTGGCAAAGCACAAAATAAAAGAAAGCAGGAAAT	
	C*- α_1	(576)	TGCACTTCAGAGAACATTGGCAAAGCACAAAATAAAAGAAAGCAGGAAAT	
	C- α_1	(372)	TGCACTTCAGAGAACATTGGCAAAGCACAAAATAAAAGAAAGCAGGAAAT	
	α_1 -WT	(846)	CTTTGGAAAGAGAAGACTTTGAAAAACAATTGCAGAGCAAGCAGTTGCA	
	C*- α_1	(626)	CTTTGGAAAGAGAAGACTTTGAAAAACAATTGCAGAGCAAGCAGTTGCA	
	C- α_1	(422)	CTTTGGAAAGAGAAGACTTTGAAAAACAATTGCAGAGCAAGCAGTTGCA	
	α_1 -WT	(896)	GCAGGAGTTCCAGTGGAGGTTATCAAAGAATCTCTTGGTGAAGAGGTTTT	
	C*- α_1	(676)	GCAG-----	-----
	C- α_1	(472)	GCAGGAGTTCCAGTGGAGGTTATCAAAGAATCTCTTGGTGAAGAGGTTTT	
	α_1 -WT	(946)	TAAAATATGTTACGAGGAAGATGAAAACATCCTTGGGGTGGTTGGAGGCA	
	C*- α_1	(680)	-----	-----
	C- α_1	(522)	TAAAATATGTTACGAGGAAGATGAAAACATCCTTGGGGTGGTTGGAGGCA	
	α_1 -WT	(996)	CCCTTAAAGATTTTTTAAACAGCTTCAGTACCCTTCTGAAACAGAGCAGC	
	C*- α_1	(680)	-----	-----AG--CAGC
	C- α_1	(572)	CCCTTAAAGATTTTTTAAACAGCTTCAGTACCCTTCTGAAACAGAGCAGC	
	α_1 -WT	(1046)	CATTGCCAAGAAGCAGGAAAAAGGGGCAGGCTTGAGGACGCCTCCATTCT	
	C*- α_1	(686)	CATTGCCAAGAAGCAGGAAAAAGGGGCAGGCTTGAGGACGCCTCCATTCT	
	C- α_1	(622)	CATTGCCAAGAAGCAGGAAAAAGGGGCAGGCTTGAGGACGCCTCCATTCT	
	α_1 -WT	(1096)	ATGCCTGGATAAGGAGGATGATTTTCTACATGTTTACTACTTCTTCCCTA	
	C*- α_1	(736)	ATGCCTGGATAAGGAGGATGATTTTCTACATGTTTACTACTTCTTCCCTA	
	C- α_1	(672)	ATGCCTGGATAAGGAGGATGATTTTCTACATGTTTACTACTTCTTCCCTA	
	α_1 -WT	(1146)	AGAGAACCACCTCCCTGATTCTTCCCGGCATCATAAAGGCAGCTGCTCAC	
	C*- α_1	(786)	AGAGAACCACCTCCCTGATTCTTCCCGGCATCATAAAGGCAGCTGCTCAC	
	C- α_1	(722)	AGAGAACCACCTCCCTGATTCTTCCCGGCATCATAAAGGCAGCTGCTCAC	
	α_1 -WT	(1196)	GTATTATATGAAACGGAAGTGGAAGTGTGTTAATGCCTCCCTGCTTCCA	
	C*- α_1	(836)	GTATTATATGAAACGGAAGTGGAAGTGTGTTAATGCCTCCCTGCTTCCA	
	C- α_1	(772)	GTATTATATGAAACGGAAGTGGAAGTGTGTTAATGCCTCCCTGCTTCCA	
	α_1 -WT	(1246)	TAATGATTGCAGCGAGTTTGTGAATCAGCCCTACTTGTTGTACTCCGTTTC	
	C*- α_1	(886)	TAATGATTGCAGCGAGTTTGTGAATCAGCCCTACTTGTTGTACTCCGTTTC	
	C- α_1	(822)	TAATGATTGCAGCGAGTTTGTGAATCAGCCCTACTTGTTGTACTCCGTTTC	
	α_1 -WT	(1296)	ACATGAAAAGCACCAAGCCATCCCTGTCCCCCAGCAAACCCAGTCCTCG	
	C*- α_1	(936)	AC ATG AAAAGCACCAAGCCATCCCTGTCCCCCAGCAAACCCAGTCCTCG	
	C- α_1	(872)	AC ATG AAAAGCACCAAGCCATCCCTGTCCCCCAGCAAACCCAGTCCTCG	
			ATG 259	

Ergebnisse

(Fortsetzung der Tabelle 3)

B	a1-WT	(1)	M 1 MFCTKLKDLKITGECFFSLLAPGQVPNESSEEAAGSSSECKATVPICQDI
	C*-a1	(1)	-----
	C-a1	(1)	-----
	a1-WT	(51)	PEKNIQESLPQRKTSRSRVYLHTLAESICKLIFPEFERLNVALQRTLAKH
	C*-a1	(1)	-----
	C-a1	(1)	-----
	a1-WT	(101)	KIKESRKSLEREDFEKTIAEQAVAAGVPVEVIKESLGEEVFKICYEEDEN
	C*-a1	(1)	-----
	C-a1	(1)	-----
	a1-WT	(151)	ILGVVGGTLKDFLNSFSTLLKQSSHQEQAGKRGRLEDASILCLDKEDDFL
	C*-a1	(1)	-----
	C-a1	(1)	-----
	a1-WT	(201)	HVYFFPKRTTSLILPGIIKAAAHVLYETEVEVSLMPPCFHNDCEFEVNO
	C*-a1	(1)	----- M PPCFHNDCEFEVNO
	C-a1	(1)	----- M PPCFHNDCEFEVNO
			M 236
	a1-WT	(251)	PYLLYSVHMKSTKPSLSPSKPQSSSLVIPTSLFCKTFPFHFMFDKDMTILQ
	C*-a1	(16)	PYLLYSVH M KSTKPSLSPSKPQSSSLVIPTSLFCKTFPFHFMFDKDMTILQ
	C-a1	(16)	PYLLYSVH M KSTKPSLSPSKPQSSSLVIPTSLFCKTFPFHFMFDKDMTILQ
			M 259
	a1-WT	(301)	FGNGIRRLMNRDFQGKPNFEEYFEILTPKINQTFSGIMTMLNMQFVVRV
	C*-a1	(66)	FGNGIRRLMNRDFQGKPNFEEYFEILTPKINQTFSGIMTMLNMQFVVRV
	C-a1	(66)	FGNGIRRLMNRDFQGKPNFEEYFEILTPKINQTFSGIMTMLNMQFVVRV
	a1-WT	(351)	RRWDNSVKKSSRVMDLKGQMIYIVESSAILFLGSPCVDRLDFTGRGLYL
	C*-a1	(116)	RRWDNSVKKSSRVMDLKGQMIYIVESSAILFLGSPCVDRLDFTGRGLYL
	C-a1	(116)	RRWDNSVKKSSRVMDLKGQMIYIVESSAILFLGSPCVDRLDFTGRGLYL
	a1-WT	(401)	SDIPIHNALRDVVLIGEQAQDGLKKRLGKLKATLEQAHQALEEEKKKT
	C*-a1	(166)	SDIPIHNALRDVVLIGEQAQDGLKKRLGKLKATLEQAHQALEEEKKKT
	C-a1	(166)	SDIPIHNALRDVVLIGEQAQDGLKKRLGKLKATLEQAHQALEEEKKKT
	a1-WT	(451)	VDLLCSIFPCEVAQQWLWQGQVQAKKFSNVTMLFSDIVGFTAICSQCSPL
	C*-a1	(216)	VDLLCSIFPCEVAQQWLWQGQVQAKKFSNVTMLFSDIVGFTAICSQCSPL
	C-a1	(216)	VDLLCSIFPCEVAQQWLWQGQVQAKKFSNVTMLFSDIVGFTAICSQCSPL
	a1-WT	(501)	QVITMLNALYTRFDQQCGELDVYKVETIGDAYCVAGGLHKESDTHAVQIA
	C*-a1	(266)	QVITMLNALYTRFDQQCGELDVYKVETIGDAYCVAGGLHKESDTHAVQIA
	C-a1	(266)	QVITMLNALYTRFDQQCGELDVYKVETIGDAYCVAGGLHKESDTHAVQIA
	a1-WT	(551)	LMALKMMELSDVMSPHGEPIKMRIGLHSGSVFAGVVGVMKMPRYCLFGNN
	C*-a1	(316)	LMALKMMELSDVMSPHGEPIKMRIGLHSGSVFAGVVGVMKMPRYCLFGNN
	C-a1	(316)	LMALKMMELSDVMSPHGEPIKMRIGLHSGSVFAGVVGVMKMPRYCLFGNN
	a1-WT	(601)	VTLANKFESCSVPRKINVSPTTYRLLKDCPGFVFTPRSREELPPNFPSEI
	C*-a1	(366)	VTLANKFESCSVPRKINVSPTTYRLLKDCPGFVFTPRSREELPPNFPSEI
	C-a1	(366)	VTLANKFESCSVPRKINVSPTTYRLLKDCPGFVFTPRSREELPPNFPSEI
	a1-WT	(651)	PGICHFLDAYQQGTNSKPCFQKKDVEDGNANFLGKASGID
	C*-a1	(416)	PGICHFLDAYQQGTNSKPCFQKKDVEDGNANFLGKASGID
	C-a1	(416)	PGICHFLDAYQQGTNSKPCFQKKDVEDGNANFLGKASGID

4.1.2 Vergleich der Expressionen der humanen $\alpha_1\Delta N_{236}$ - und der C- α_1 -Untereinheit

In einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe (KOGLIN, 2002) wurde die $\alpha_1\Delta N_{236}$ - im Vergleich zur $\alpha_1\Delta N_{259}$ -Untereinheit (beide human) untersucht, wobei es nicht gelang einen Größenunterschied beim Western-Blot zwischen diesen beiden Deletionsmutanten nachzuweisen. Theoretisch läge dieser bei 2,7 kDa (51,2 kDa für $\alpha_1\Delta N_{236}$ und 48,5 kDa für $\alpha_1\Delta N_{259}$). Damit kann ATG₂₅₉ als das über ATG₂₃₆ dominierende Startcodon angenommen werden (Abbildung 27), so dass das C- α_1 -Protein dem $\alpha_1\Delta N_{259}$ -Protein entspricht. Im Rahmen der damaligen Arbeit wurden die beiden α_1 -Deletionsmutanten wie unter 3.2.5.3 und 3.2.5.4 kloniert und in *Sf9*-Zellen exprimiert. Durch die unter 3.2.5.3 verwendete Klonierungsstrategie (über *PvuII*) blieben 41 bp vor dem Startmethionin erhalten, so dass etwaige Translationseffekte vergleichbar sein werden wie bei den beiden Spleißvarianten (C- α_1 /C*- α_1).

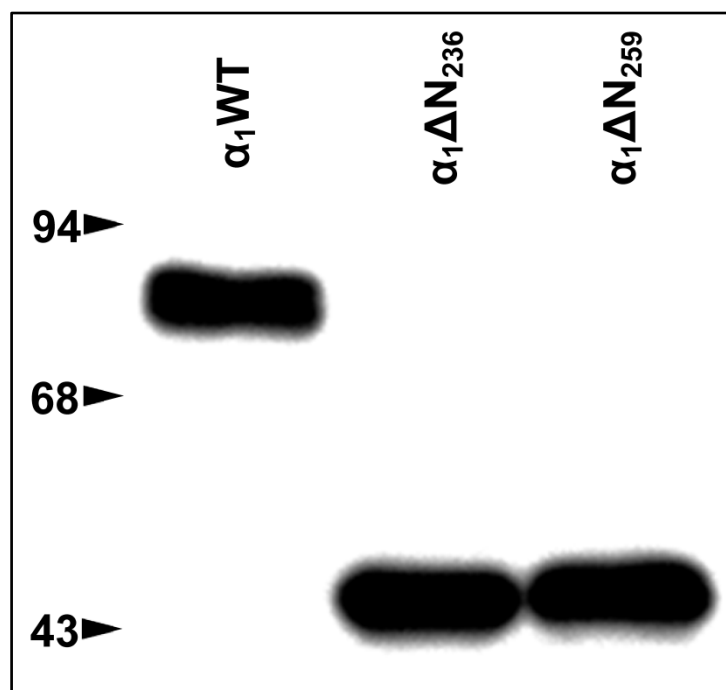


Abbildung 26

Charakterisierung der Expression der α_1 -Untereinheiten im Cytosol aus *Sf9*-Zellen mittels Western-Blot (anti- α_1 -Antikörper, AK 1200), welche mit den entsprechenden α_1 -Konstrukten infiziert worden waren. Alle Spuren wurden mit 40 μ g Protein beladen. Das hier gezeigte Gel ist ein repräsentatives Ergebnis, wobei das Experiment mindestens dreimal wiederholt wurde. [kalkulierte Molekulargewichte: α_1 WT, 77,6 kDa; $\alpha_1\Delta N_{236}$, 51,2 kDa; $\alpha_1\Delta N_{259}$, 48,5 kDa] (KOGLIN, 2002; KRAEHLING ET AL., 2011).

Ergebnisse

Zur Untersuchung, inwieweit sich die *Kozak*-Sequenzen von $\alpha_1\Delta N_{236}$ und $\alpha_1\Delta N_{259}$ bezüglich ihrer Fähigkeit zur Initiation der Translation unterscheiden, sollten verschiedene in der Literatur veröffentlichte Vorhersageprogramme auf die Sequenzen angewendet werden. Als zusätzliche Kontrolle der Validität dieser Programme sollte das Transkript des Wildtyps parallel analysiert werden. Wendet man beispielsweise NetStart 1.0 (PEDERSEN AND NIELSEN, 1997), eines der am häufigsten verwendeten Vorhersageprogramme für den Translationsstart (NADERSHAHI ET AL., 2004) auf den Wildtyp bzw. die beiden Spleißvarianten (C- α_1 /C*- α_1) an, so erkennt der Algorithmus nur beim ATG₁ das Startcodon (Wert: 0,754⁴⁵), bewertet aber die Startcodons $\alpha_1\Delta N_{236}$ und $\alpha_1\Delta N_{259}$ als zu schwach zur Einleitung der Transkription (Werte: 0,478 resp. 0,227). Demgegenüber erkennt der Algorithmus des WeakAUG Servers (TIKOLE AND SANKARARAMAKRISHNAN, 2008), das ATG₁ nicht und klassifiziert ATG₂₅₉ geringfügig stärker als ATG₂₃₆ (0,9999 gegenüber 0,9994). Entsprechend der Diskrepanz dieser *in silico* Vorhersagen scheint die Aussage von Zeng et al. (ZENG ET AL., 2009) zuzutreffen, welche in ihrer Arbeit beschreiben, dass die bis dato verfügbaren Algorithmen nicht zuverlässig die Initiationssequenz innerhalb eines Transkriptes zu identifizieren vermögen. Solche Programme haben sicherlich ihre Berechtigung, wenn es um die Analyse großer Datensätze (z.B. Humanes Genomprojekt) geht, sind aber im Vergleich zu experimentellen Untersuchungen (Abbildung 26) bedeutungslos.

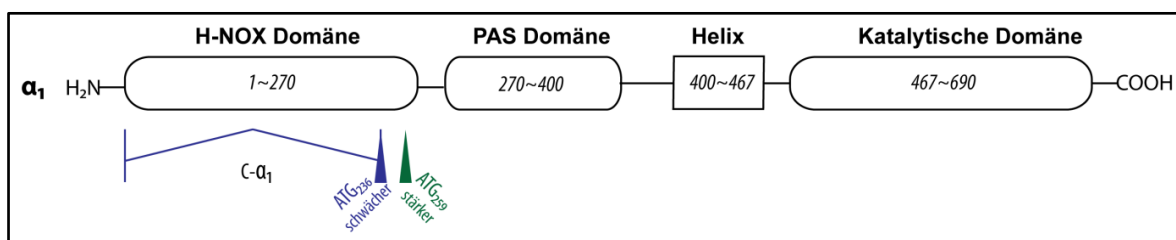


Abbildung 27

Schematische Darstellung (modifiziert nach DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009) **der beiden Startcodons** ATG₂₃₆ und ATG₂₅₉ der α_1 -Untereinheit der NOsGC.

⁴⁵ Entsprechend des Algorithmus von Pedersen und Nielsen, werden Werte über 0,5 als mögliche Transkriptionsstarts angenommen.

4.1.3 Etablierung einer neuen Ein-Schritt-Anreinigung der NOsGC

Zur Untersuchung der Dimerisierungsfähigkeit des C- α_1 -Proteins mit der β_1 -Untereinheit wurde eine neue Methode zur Anreinigung der NOsGC entwickelt. In einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe, waren die während der Anreinigung erhaltenen Fraktionen auf Enzymaktivität hin untersucht worden. Nur diejenigen Fraktionen wurden weiterverwendet, in denen Aktivität nachweisbar war (Koglin and Behrends, 2003). Wagner et al. (Wagner et al., 2005) sahen darin einen möglichen falsch-positiven Nachweis. Es hätte die Möglichkeit bestehen können, dass nur ein kleiner Anteil der α_1 -Deletionsmutanten ($\alpha_1\Delta N_{259}$) in der Lage gewesen wäre, zu dimerisieren und ein enzymatisch aktives Dimer mit der β_1 -Untereinheit zu bilden. Genau diese Dimere wären es dann gewesen, welche Koglin und Behrends angereinigt hätten. Um einen von der Enzymaktivität unabhängigen Nachweis der Dimerisierung zu erbringen, wurde die β_1 -Untereinheit carboxyterminal mit einem Strep Tag II fusioniert (vgl. 3.2.5.7), um eine Anreinigung mit Hilfe des Strep-Tactins (vgl. 3.6.1) zu ermöglichen. Eine analoge Strategie wurde auch von Wagner et al. gewählt. Die für diese Arbeit entwickelte Anreinigungsmethode ist aufgrund der Nutzung einer einzigen Säulenchromatographie schnell und einfach durchzuführen, führt aber dennoch zu einem hochreinen Enzym von über 95%iger Reinheit (bestimmt durch Densitometrie; vgl. Abbildung 28) und einer Ausbeute von über 25 % (bestimmt über das Verhältnis der totalen Enzymaktivität im Cytosol zu der in der angereinigten Fraktion; vgl. Tabelle 4). Im Allgemeinen wurden aus einer 1.000 ml S9-Zellkultur etwa 1 mg angereinigte NOsGC erhalten. Zur weiteren Charakterisierung der Anreinigung wurde das angereinigte Dimer aus α_1/β_1 -S der NOsGC mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Silberfärbe-System (GE Healthcare) auf einem Gel sichtbar gemacht und der selbsthergestellten Coomassie-Färbelösung nach Kang (Kang et al., 2002) gegenübergestellt. Auch mit der als sehr sensitiv geltenden Silberfärbung konnte die resultierende Reinheit bei der Nutzung, der für diese Arbeit entwickelten Anreinigungsmethode bestätigt werden (Abbildung 29). Um auszuschließen, dass die bei der Anreinigung gewählten Bedingungen zu einer Aggregation des Enzyms führen, welche unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE nicht erkennbar wären, wurde, wie unter 3.9 beschrieben, eine Gelfiltration des angereinigten Enzyms durchgeführt (Abbildung 30). Diese ergab außer dem Absorptionsmaximum der dimeren NOsGC keine weiteren Maxima, die

Ergebnisse

auf das Vorhandensein von Agglomeraten der NOsGC hindeuteten. Insgesamt konnte so die Eignung der Anreinigungsmethode gezeigt werden.

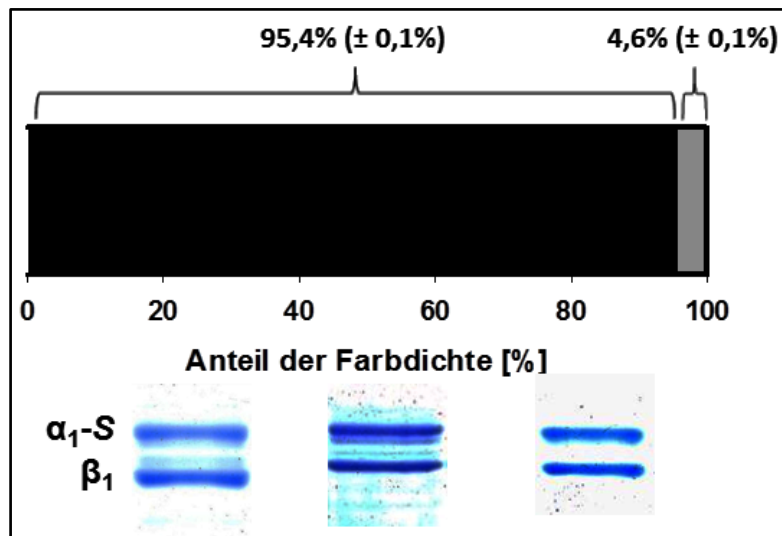


Abbildung 28

Densitometrische Auswertung der Reinheit des α_1 -S/ β_1 -Dimers nach der Anreinigung. Dargestellt sind drei voneinander unabhängig durchgeführte Anreinigungen (jeweils 1 μ g pro Bande). ■, Intensität der Banden ($\alpha_1 + \beta_1$); ■, Intensität der Zwischenräume (entspricht der Verunreinigung). Aufgetragen wurde jeweils 1 μ g pro Spur.

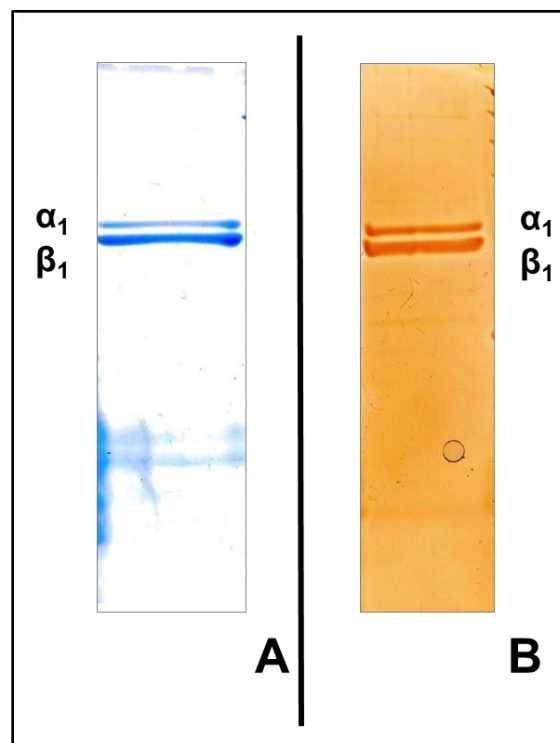


Abbildung 29

Gegenüberstellung der Coomassie-Färbung nach Kang [A] (KANG ET AL., 2002) und der **Silberfärbung** [B] (PlusOne Silver Staining Reagenzsystem). Je Spur wurde 1 μ g Enzym (α_1 / β_1 -S) aufgetragen, welches bei einer Anreinigung erhalten wurde.

Tabelle 4

Übersicht über die Anreicherung der NOsGC mittels *Strep-Tag II/Strep-Tactin*. Dargestellt sind die Daten für eine repräsentative Anreicherung.

* Anreicherungsfaktor

Spezifische Aktivität der resultierenden Fraktion dividiert durch die spezifische Aktivität des Cytosols.

Stimulationsfaktor

Quotient aus NO-stimulierter spezifischer Aktivität und basaler spezifischer Aktivität.

‡ Ausbeute

NO-stimulierte totale Aktivität der Fraktion dividiert durch die NO-stimulierte totale Aktivität des Cytosols.

	Volumen [ml]	Protein- konzentration [mg/ml]	Protein- menge [mg]	Totale Aktivität [nmol · min ⁻¹]		Spezifische Aktivität [nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹]		Anreicherungsfaktor *	Stimulationsfaktor #	Ausbeute ‡ [%]
				basal	NO-stimuliert	basal	NO-stimuliert			
α ₁ -S/β ₁ Cytosol	22	9,2	204,4	265,7	10996,7	1,3	53,8	---	42	---
α ₁ -S/β ₁ StrepPool	0,4	1,1	0,44	165,4	2820,4	376,0	6410,1	119	17	26

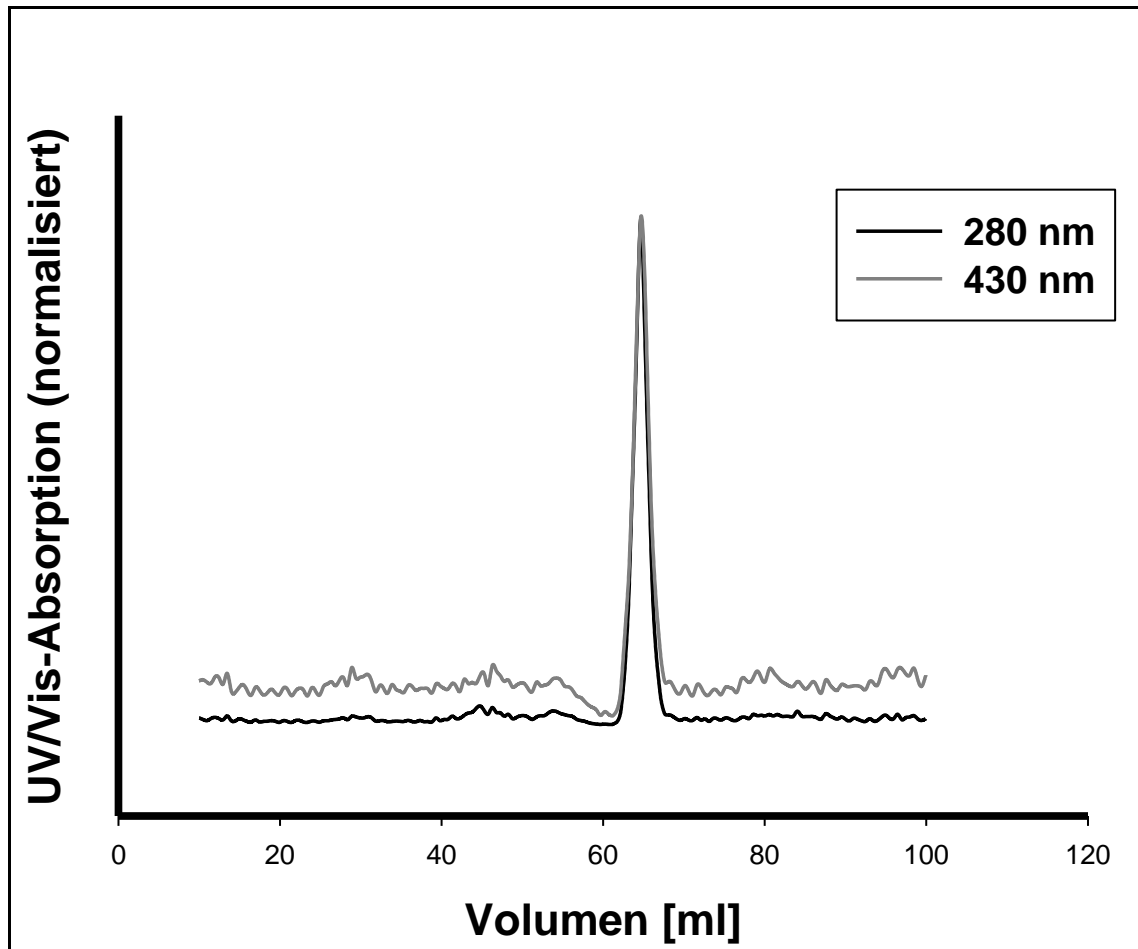
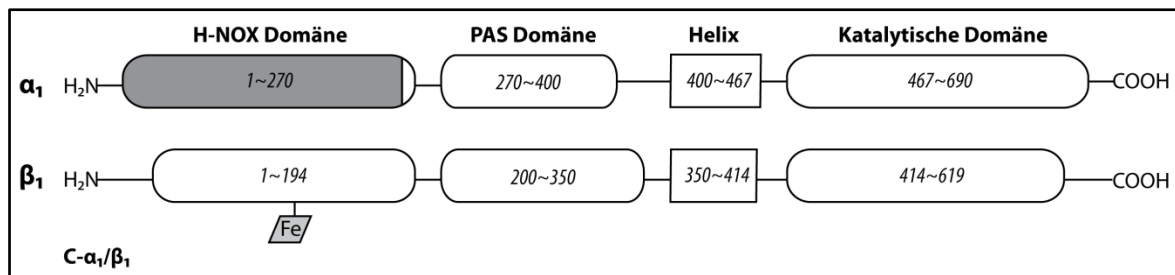


Abbildung 30

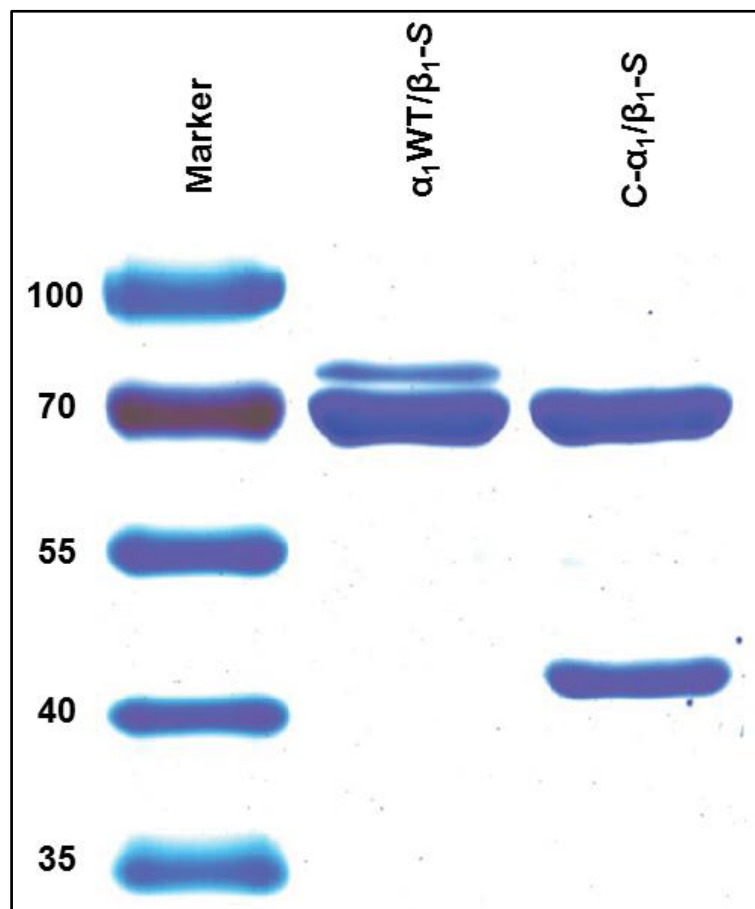
Gelfiltration der NOsGC (α_1 -S/ β_1) zum Ausschluss etwaiger Agglomerate nach der Anreinigung mittels *Strep* Tag II/*Strep*-Tactin. Es wurden 250 μ g Protein aufgetragen.

4.1.4 Untersuchung der Dimerisierungsfähigkeit des C- α_1 -Proteins mit Hilfe der Anreinigung über die β_1 -Untereinheit

Zur Untersuchung der Dimerisierungsfähigkeit des C- α_1 -Proteins wurde dieses mit β_1 -S in *Sf9*-Zellen koexprimiert und mittels Affinitätschromatographie angereinigt. Zum Vergleich wurde der Wildtyp von α_1 unter gleichen Bedingungen angereinigt und mittels SDS-PAGE/Coomassie charakterisiert (Abbildung 32). Entsprechend dieses Vorgehens wurden Chimäre der NOsGC aus Ratte und Mensch gebildet. Dies erscheint aber legitim, wenn man die ausgeprägte Konservierung der NOsGC über die Speziesgrenzen hinweg betrachtet (vgl. Anhang – 7.3).

**Abbildung 31**

Visualisierung des C- α_1 -Proteins (modifiziert nach DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009). Der fehlende Aminoterminus des C- α_1 -Proteins ist grau markiert. Zusätzlich ist die β_1 -Untereinheit dargestellt.

**Abbildung 32**

SDS-PAGE Analyse der NOsGC-Konstrukte. Je Spur wurden 5 μ g des angereinigten Konstrukts mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt. Das Experiment wurde mehr als drei Mal durchgeführt und ein repräsentatives Gel ist abgebildet. Entsprechend den Aminosäuresequenzen kalkultiertes Molekulargewicht: α_1 WT, 77,6 kDa; C- α_1 , 48,5 kDa; β_1 -S, 71,4 kDa.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde eine Western-Blot-Analyse der entsprechenden angereinigten Konstrukte durchgeführt (Abbildung 33).

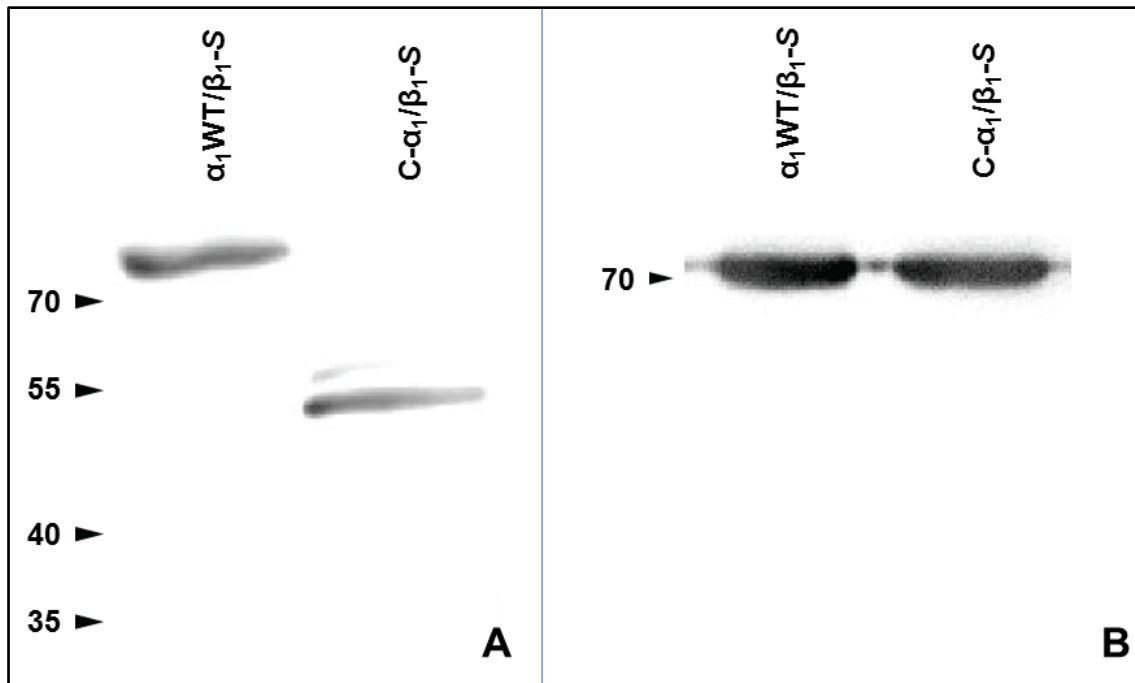
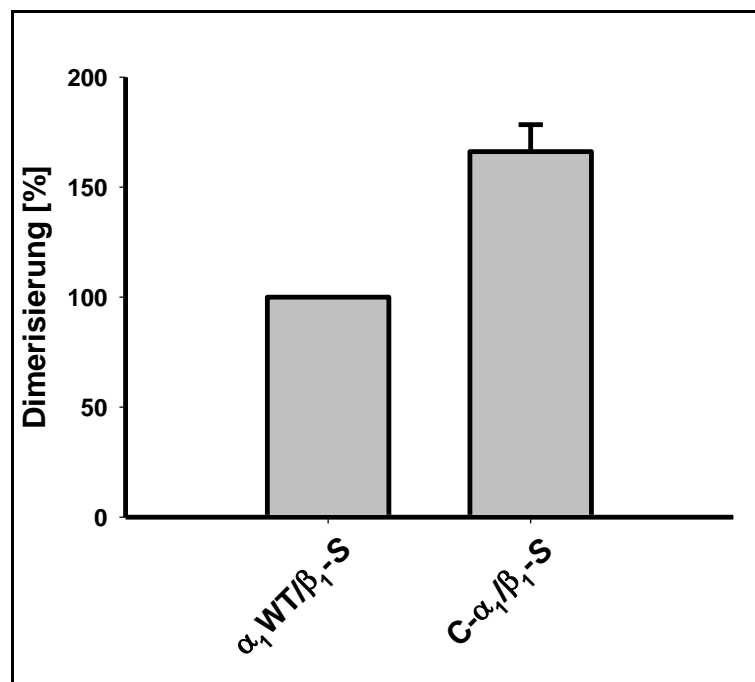


Abbildung 33

Western-Blot-Analyse der NOsGC-Konstrukte. Aufgetragen wurden je 5 µg des angereinigten Proteins. A, anti-α₁-Antikörper (G4280, Sigma-Aldrich); B, anti-β₁ Antikörper (G4530, Sigma-Aldrich).

Zur Quantifizierung der Dimerisierung wurde eine densitometrische Untersuchung (LabImag 1D, Kapelan) der Coomassie-gefärbten Gele durchgeführt (Abbildung 34). Diese ergab für die Spleißform der NOsGC (C-α₁) relativ gesehen eine 166,2%ige ($\pm 12,2\%$) Dimerisierung verglichen mit dem Wildtyp. Allerdings bleibt fraglich, warum es ausreicht, die Farbdichten miteinander ins Verhältnis zu setzen, wie bei Wagner et al. (WAGNER ET AL., 2005) und aus Gründen der Vergleichbarkeit auch hier geschehen, da für eine stöchiometrische Aussage (Dimerisierung) das differierende Molekulargewicht (α_1 WT: 77,6 kDa zu $\alpha_1\Delta N_{259}$: 48,5 kDa) theoretisch zu berücksichtigen wäre. Betrachtet man die unter 3.7.1 beschriebenen, molekularen Interaktionen, auf denen die Anfärbung von Proteinen durch Coomassie-Brillant-Blau G-250 beruhen, so müsste gelten, dass n Proteine mit einem Molekulargewicht von 77,6 kDa die gleiche Farbdichte ergäben wie $\left(\frac{77,6 \text{ kDa}}{48,5 \text{ kDa}}\right) 1,6 n$ Proteine mit einem Molekulargewicht von 48,5 kDa. Folgte man dieser Überlegung, so ergäbe die densitometrische Auswertung der Dimerisierung für C-α₁ etwa 269 %.

**Abbildung 34**

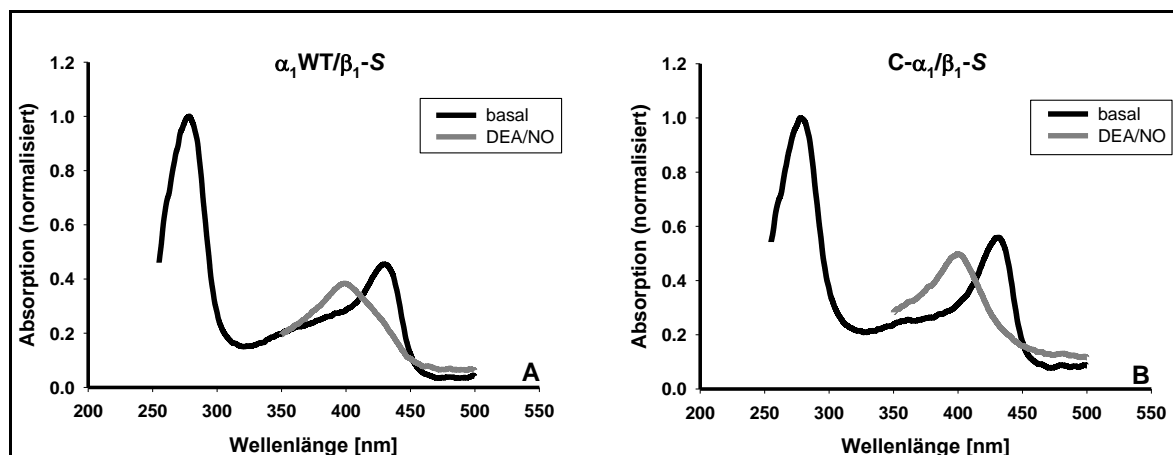
Densitometrische Analyse der Dimerisierung. Zur Quantifizierung der Dimerisierung wurden die optischen Dichten der Coomassie-gefärbten Banden bestimmt. Die für α_1 WT und C- α_1 erhaltenden Werte wurden mit dem für β_1 -S der entsprechenden Bande normalisiert. Die Dimerisierung ist angegeben in Prozent der Dimerisierung des Wildtyps.

Zur funktionalen Untersuchung des Dimers aus C- α_1 und β_1 -S wurden zum einen spektroskopische Untersuchungen (Abbildung 35) sowie zum anderen Enzymaktivitätsbestimmungen (Abbildung 36) durchgeführt und diese mit dem α_1 WT-Untereinheit verglichen.

Die aminoterminal verkürzte Variante der α_1 -Untereinheit der NOsGC zeigt, ebenso wie der Wildtyp (Abbildung 35A), nach der Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit (Abbildung 35B) eine Absorption im Bereich von 430 nm – die sogenannte Soret⁴⁶- oder γ -Bande, welche die Hämhaltigkeit des Enzyms belegt. Nach 10 minütiger Inkubation mit 100 μ M DEA/NO bei 37 °C kann man eine deutliche Blauverschiebung der Soretbande erkennen, die hiernach bei etwa 400 nm liegt.

⁴⁶ Intensive Absorptionsbande im UV/Vis-Spektrum, die nach ihrem Erstbeschreiber *Jacques-Louis Soret* benannt wurde (SORET, 1883).

Ergebnisse

**Abbildung 35**

UV/Vis-Spektroskopie von $\alpha_1\text{WT}/\beta_1\text{-S}$ (A) und $\text{C-}\alpha_1/\beta_1\text{-S}$ (B). Die durchgezogene Linie entspricht der Absorption unter basalen Bedingungen und die gestrichelte Linie zeigt die Absorption in Gegenwart von 100 μM NO (DEA/NO als NO-Donor).

Tabelle 5

Gegenüberstellung der Absorptionsmaxima der UV/Vis-Spektroskopie der NOsGC-Konstrukte (Abbildung 35) unter Angabe der relativen Absorptionskoeffizienten (Werte in Klammern).

	λ_{max} [nm] (ϵ_{rel})			
	$\alpha_1\text{WT}/\beta_1\text{-S}$		$\text{C-}\alpha_1/\beta_1\text{-S}$	
basal	278 (1)	429 (0,45)	278 (1)	431 (0,56)
NO [DEA/NO (100 μM)]		399 (0,38)		400 (0,50)

Die nach der Koexpression der $\text{C-}\alpha_1\text{-}$ mit der $\beta_1\text{-}$ Untereinheit nachgewiesene Enzymaktivität (Abbildung 36) belegt die Bildung katalytisch aktiver Heterodimere. Deutlich wird, dass die aminoterminal verkürzte Untereinheit der $\alpha_1\text{-}$ Untereinheit sowohl basal als auch NO-stimuliert, erhöhte Enzymaktivität aufweist. Betrachtet man die unter den stimulierten Bedingungen gewonnenen Ergebnisse, so zeigt sich eine etwa dreifach höhere Aktivität von $\text{C-}\alpha_1/\beta_1\text{-S}$ gegenüber $\alpha_1\text{WT}/\beta_1\text{-S}$. Vermutlich lässt sich dies mit einer vermehrten Bildung an aktiven Heterodimeren erklären. Das $\text{C-}\alpha_1\text{-}$ Protein ist kleiner als das $\alpha_1\text{WT-}$ Protein und kann dementsprechend je

Zeiteinheit vermehrt gebildet werden und so mehr Heterodimere mit der β_1 -Untereinheit ausbilden.

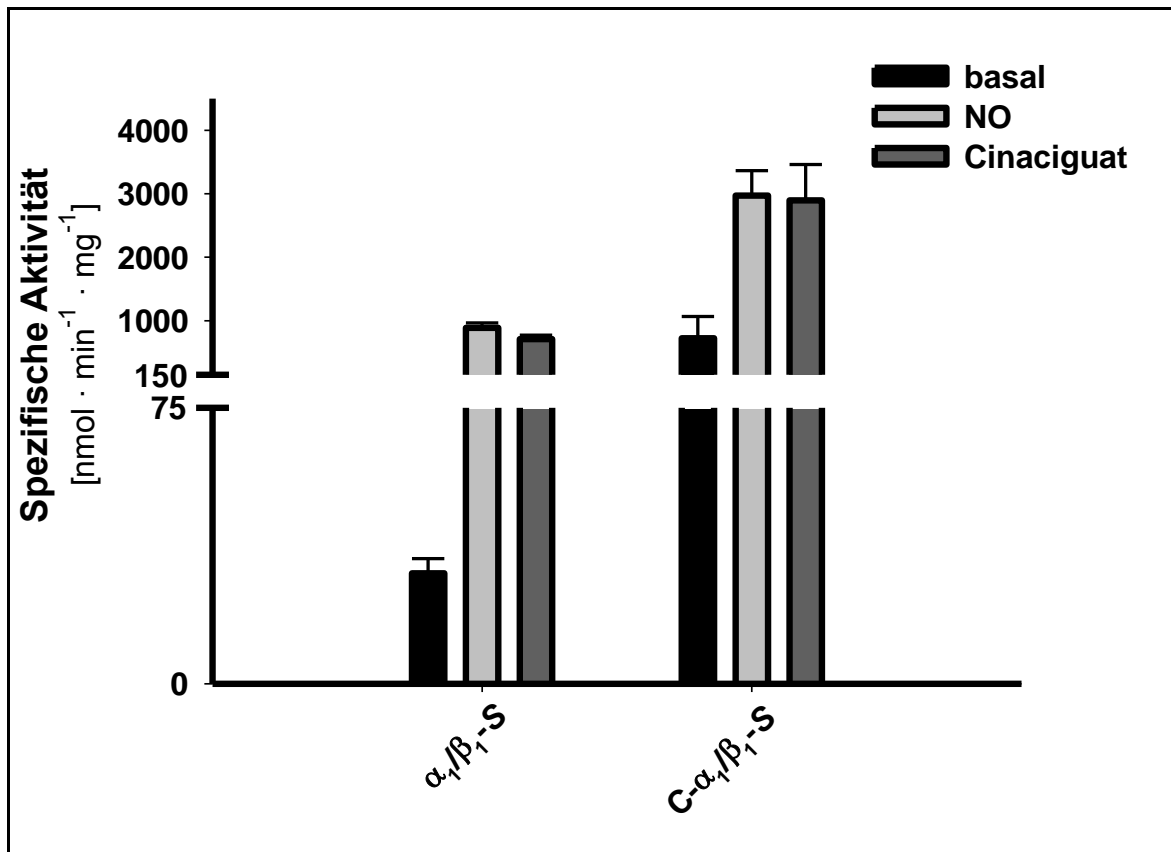


Abbildung 36

Guanylyl-Cyclase Aktivität der beiden NOGC-Varianten. Die spezifische Aktivität wurde unter basal (schwarze Balken), in der Gegenwart von 100 μ M NO (DEA/NO, hellgraue Balken und in der Gegenwart von 10 μ M Cinaciguat (dunkelgraue Balken) bestimmt. Die Bestimmung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Um zu prüfen, ob der Diskrepanz zwischen den hier dargestellten Ergebnissen und denen von *Wagner* et al. ein technischer Grund zugrunde liegt, wurde die Expression in *Sf9*-Zellen möglichst nahe am Protokoll von *Wagner* et al. orientiert. Diese verwendeten zur Kultivierung der *Sf9*-Zellen einen Zusatz von 1 % (V/V) Lipid Medium Supplement (LMS), einer Substanz zur Reduktion der Scherkräfte in Suspensionskulturen, und setzten außerdem 4 mg/l Hämin zu. Um zu prüfen, welchen Einfluss diese beiden Zusätze auf die Dimerisierung der C- α_1 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit haben könnten, wurden Anreinigungen durchgeführt, bei denen der Zellkultur zuvor entweder nur Hämin oder Hämin und das LMS zugesetzt worden war. Als Kontrolle diente die Anreinigung einer nativen Zellkulturpräparation

Ergebnisse

(Abbildung 37). Offensichtlich übt weder der Zusatz von Hämin, noch der des LMS einen Einfluss auf die Dimerisierung aus.

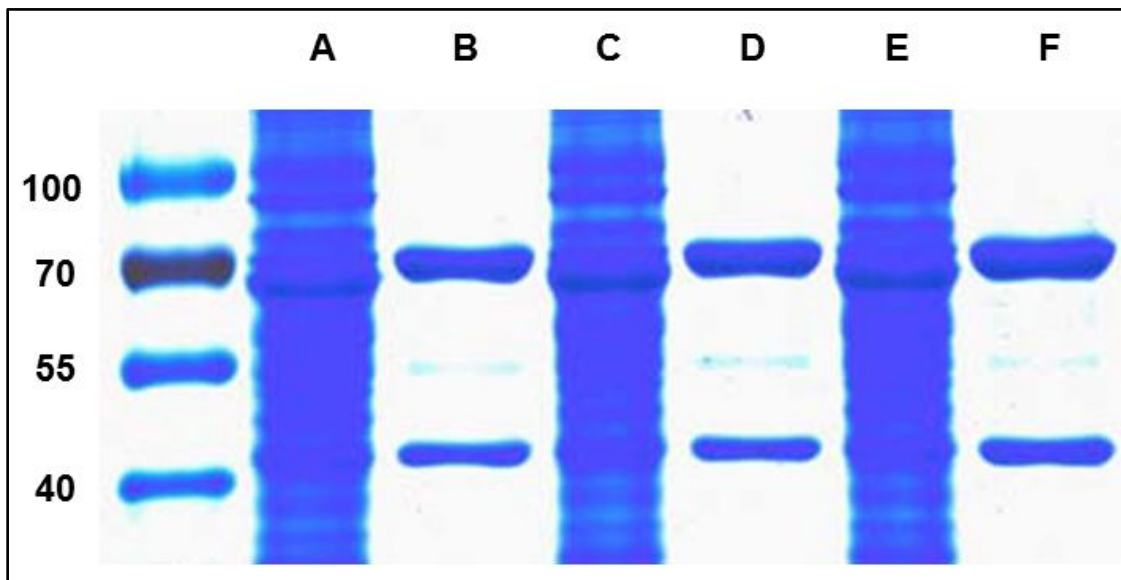


Abbildung 37

Coomassie-Färbung cytosolischer und angereinigter Proteine. 50 µg Cytosol oder 5 µg gereinigtes Enzym wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit Coomassie-Brillant-Blau G250 gefärbt. A, Cytosol und B, angereinigtes Enzym – Zellkultur ohne Hämin- oder LMS-Zusatz; C, Cytosol und D, angereinigtes Enzym – Zellkultur mit Hämin-Zusatz, aber ohne LMS-Zusatz; E, Cytosol und F, angereinigtes Enzym – Zellkultur mit Hämin- und LMS-Zusatz. Dargestellt ist ein repräsentatives Gel (n = 3).

4.1.5 FLIM-FRET-Untersuchungen zur Dimerisierung

Als weitere Nachweismethode der Dimerisierung des C- α_1 -Proteins mit der β_1 -Untereinheit wurde die Fluoreszenzlebenszeit des verbesserten FRET-Donors Cyan Fluoreszierendes Protein [(E)CFP] bestimmt. Dazu wurde die C- α_1 -Untereinheit als auch die α_1 WT-Untereinheit carboxyterminal mit ECFP und β_1 -Untereinheit carboxyterminal mit dem dazugehörigen FRET-Akzeptor EYFP fusioniert. Um auszuschließen, dass die Wahl der Fusionspartner (α_1 -Konstrukte mit ECFP und β_1 mit EYFP) Einfluss auf die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit nimmt, wurden die Fusionen auch *vice versa* ausgeführt und alle Kombinationen mittels FLIM untersucht. Ein solcher Einfluss wäre aufgrund der deutlich differierenden relativen Helligkeiten (bezogen auf EGFP) der beiden Fluoreszenzproteine ECFP ($\approx 40\%$) und EYFP ($\approx 150\%$) theoretisch denkbar gewesen (VEITH AND VEITH, 2005; MARTIN ET AL., 2009). Zwar ist die Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit intensitätsunabhängig, allerdings bestände die Möglichkeit, dass Homodimere der

β_1 -Untereinheit (ZABEL ET AL., 1999) zu einer Beeinflussung der Fluoreszenzlebenszeit hätten führen können. Die Expression der Konstrukte erfolgte in HEK-293 Zellen. Unter beiden experimentellen Bedingungen war die Fluoreszenzlebenszeit des ECFP bei der C- α_1 -Untereinheit als auch beim Wildtyp signifikant reduziert, so dass sich auch mit Hilfe des FLIMs die Dimerisierung nachweisen ließ (Abbildung 38).

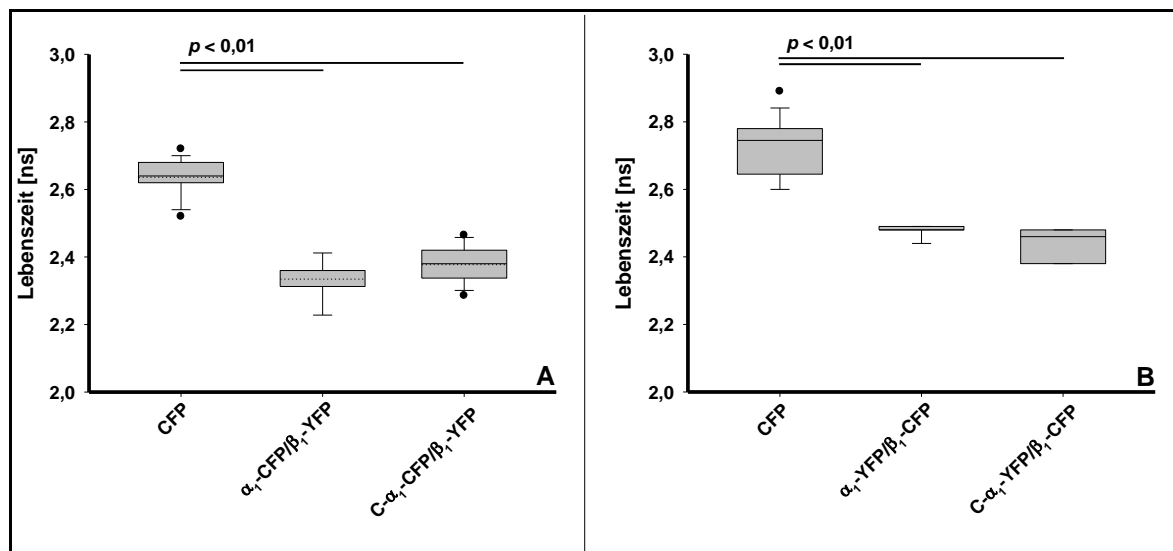


Abbildung 38

Fluoreszenzlebenszeiten des FRET-Donors ECFP. Dargestellt als Box-Plot-Analyse. A, Ansatz, bei dem die α_1 -Konstrukte mit ECFP (Donor) fusioniert worden sind. B, Ansatz bei dem die α_1 -Konstrukte mit EYFP (Akzeptor) fusioniert worden sind. Die Daten innerhalb des Rechtecks (Box) zeigen die des 25er/75er-Quantils an. Die Whisker⁴⁷ beschreiben die Daten, welche sich innerhalb des 5er/95er-Quantils befinden. Außerhalb dessen liegende Punkte geben Ausreißer an. Die durchgezogene Linie innerhalb der Box zeigt den Median an, die gestrichelte den Mittelwert.

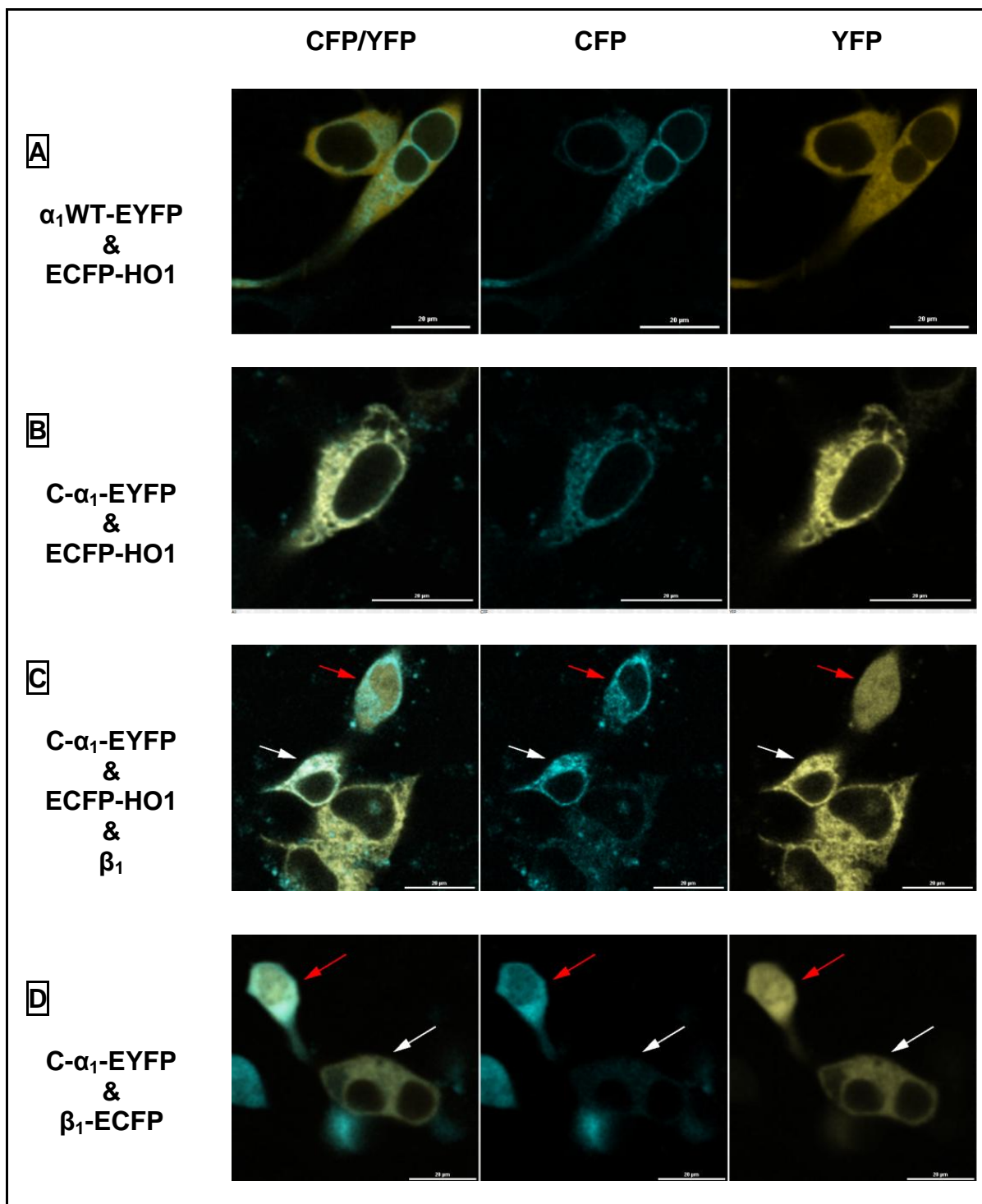
4.1.6 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von C- α_1

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der C- α_1 -Untereinheit wurde diese carboxyterminal mit EYFP fusioniert, in HEK-293 Zellen exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie betrachtet. Als Vergleich wurde der Wildtyp unter den gleichen Bedingungen untersucht. Der Wildtyp der α_1 -Untereinheit zeigte erwartungsgemäß eine cytosolische Verteilung (Abbildung 39A), wohingegen die Spleißform der α_1 -Untereinheit (C- α_1) sich nicht cytosolisch verteilte, sondern eher perinukleär (Abbildung 39B). Da die subzelluläre Distribution von C- α_1 auf eine

⁴⁷ *whisker*, englisch für Barthaar oder Schnurrhaar (z.B. bei Katzen) (Langenscheidt Online-Wörterbücher, Großwörterbuch Englisch, 2011) Von *John Wilder Tukey* eingeführter Ausdruck zur Beschreibung der Markierungslinie für die 5er/95er-Quantilen (TUKEY, 1977).

Ergebnisse

endoplasmatische Lokalisation schließen ließ, wurde zusätzlich zu den α_1 -Konstrukten, die aminoterminal mit ECFP fusionierte humane Hämoxygenase-1 (HO1) exprimiert (Abbildung 39A, B und C). Diese kann als Marker für das endoplasmatische Retikulum dienen (MAINES, 1988). Transfiziert man die HEK-293 Zellen neben C- α_1 -EYFP und ECFP-HO1 zusätzlich mit der nicht-markierten β_1 -Untereinheit (Abbildung 39C), so erkennt man, dass in einigen Zellen die subzelluläre Verteilung wieder der des Wildtyps ähnelt. Es kann davon ausgegangen werden, dass in eben diesen Zellen eine dreifache Transfektion stattgefunden hat. Somit scheint in der Gegenwart von β_1 die besondere perinukleäre subzelluläre Verteilung von C- α_1 aufgehoben zu werden. Um dies auch zeigen zu können, wurde C- α_1 -EYFP mit der carboxyterminal ECFP-markierten β_1 -Untereinheit transfiziert (Abbildung 39D). So ließ sich die Vermutung bestätigen, dass in der Gegenwart der β_1 -Untereinheit (Abbildung 39D) auch die C- α_1 -Untereinheit eine cytosolische mit dem Wildtyp vergleichbare Verteilung aufweist.

**Abbildung 39**

Expression von α_1 WT-EYFP und C- α_1 -EYFP in HEK-293 Zellen. Als Marker für das endoplasmatische Retikulum wurde ECFP-HO1 cotransfiziert. A, α_1 WT zeigt cytosolische Verteilung. B, C- α_1 zeigt eine der HO1 ähnliche subzelluläre Lokalisation. C, durch den Zusatz von nicht-markiertem β_1 kommt es in einigen Zellen zu einer Aufhebung der granulären Verteilung (roter Pfeil). D, nur in den Zellen, die gleichzeitig C- α_1 und β_1 exprimieren wird die granuläre Verteilung von C- α_1 aufgehoben (roter Pfeil). Die Länge der weißen Balken entspricht 20 μ m.

4.1.7 Analyse des Redox-Status von α_1 Wildtyp und C- α_1

Zur Untersuchung des Redox-Verhaltens von α_1 Wildtyp und C- α_1 wurden diese beiden α_1 -Untereinheiten carboxyterminal mit dem Redox-Sensor Grx1-roGFP2 (GUTSCHER ET AL., 2008) fusioniert (vgl. 3.2.5.16 und 3.2.5.17). Die cDNA für Grx1-roGFP2 war ein Geschenk der Arbeitsgruppe um *Tobias Dick* (DKFZ, Heidelberg). Der Redoxsensor roGFP2 basiert auf dem grün fluoreszierenden Protein (EGFP). Durch die Einführung zweier außenliegender Cysteine im EGFP (HANSON ET AL., 2004), deren Abstand im reduzierten Zustand etwa 3,4 Å beträgt, wurde ein oxidationsempfindliches EGFP geschaffen. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke führt zu einer Verkürzung des Abstands der beiden Cysteine auf etwa 2,0 Å. Die durch Oxidation bewirkte Konformationsänderung führt zu einer Änderung des Anregungsspektrums. Die Erweiterung des Redoxsensors roGFP2 mit dem humanen Glutaredoxin-1 (Grx1) durch die Arbeitsgruppe von *Tobias Dick* bewirkt eine höhere Sensitivität und beschleunigte Reaktion des roGFP2 (GUTSCHER ET AL., 2008). Die Auswertung des Redox-Status von Grx1-roGFP2 erfolgt ratiometrisch, da sich die Anregungsspektren von reduziertem und oxidiertem Grx1-roGFP2 deutlich unterscheiden (vgl. Abbildung 40). Im reduzierten Zustand (roter Graph) lässt sich Grx1-roGFP2 intensiv mit der Wellenlänge 488 nm anregen. Im oxidierten Zustand geht die Anregung bei dieser Wellenlänge deutlich zurück und stattdessen ist eine Anregung bei 405 nm möglich, so dass man durch die Bildung eines Quotienten der Intensitäten (hier: $\frac{\text{Intensität bei 405 nm}}{\text{Intensität bei 488 nm}}$) eine Aussage über den Redox-Status treffen kann. Je kleiner der Quotient ist, desto mehr reduziertes Grx1-roGFP2 liegt vor und *vice versa*.

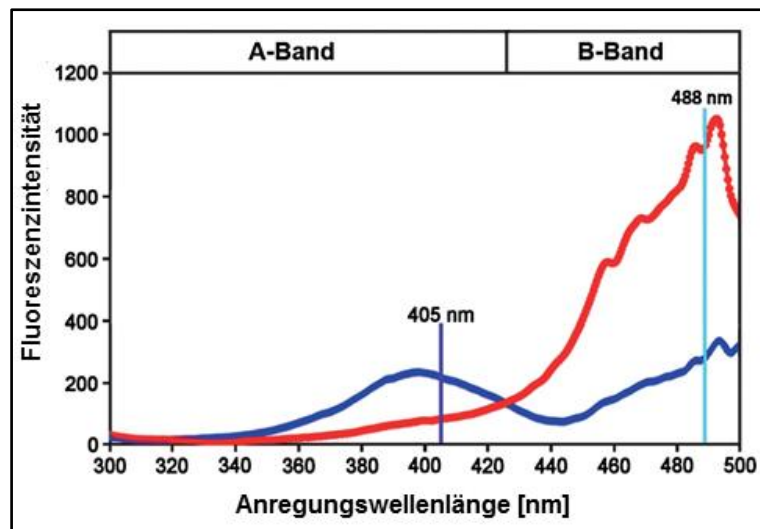
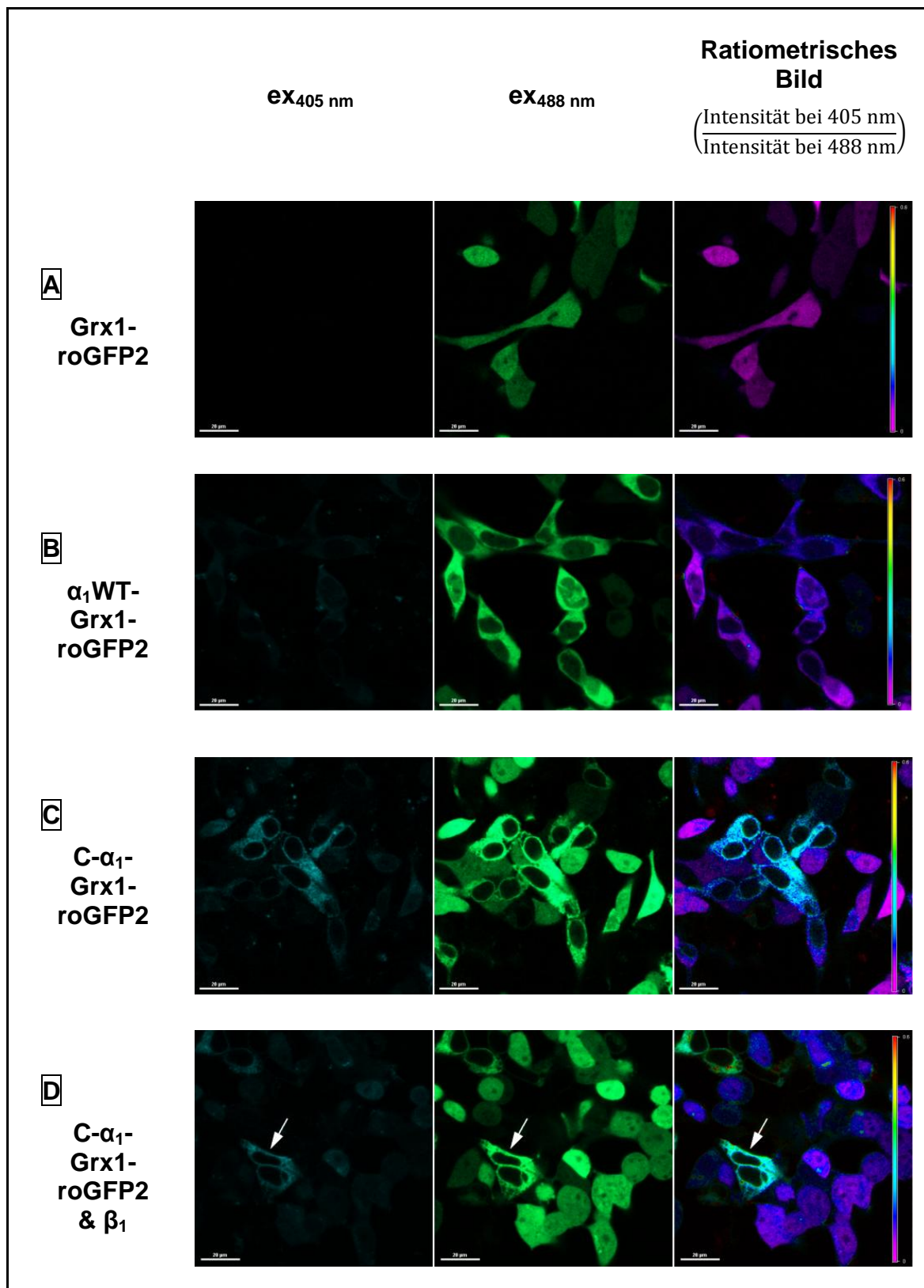


Abbildung 40

Anregungsspektrum von roGFP2 in Abhängigkeit vom Redox-Status (roter Graph, reduzierte Form; blauer Graph, oxidierte Form). Das Bild wurde modifiziert nach MEYER AND DICK, 2010.

In Tabelle 6 sind die gewonnenen Ergebnisse zusammengestellt. Der α_1 WT zeigt eine, wie schon zuvor gesehene (Abbildung 39A) cytosolische Verteilung und befindet sich in einem weitestgehend reduzierten Milieu (Tabelle 6B). Die C- α_1 -Untereinheiten hingegen ist einer deutlich oxidierteren Umgebung ausgesetzt (Tabelle 6C), wobei erneut der Zusatz der β_1 -Untereinheit diese besondere Eigenschaft der Spleißform aufzulösen vermag (Tabelle 6D).

Ergebnisse

Tabelle 6Bestimmung des Redox-Verhaltens von α_1 WT und C- α_1 .

4.2 Weitergehende Untersuchungen zur Dimerisierung der NOsGC-Untereinheiten

4.2.1 Einfluss einer weitergehenden aminoterminalen Trunktion der α_1 -Untereinheit ($\alpha_1\Delta N_{364}$)

Ausgehend vom Nachweis, dass die Spleißform von α_1 ($\alpha_1\Delta N_{259}$) enzymatisch aktive Dimere mit der β_1 -Untereinheit ausbilden kann, sollte untersucht werden, inwieweit sich eine weitergehende Deletion des Aminoterminus (Abbildung 41) auf die Dimerisierung auswirkt.

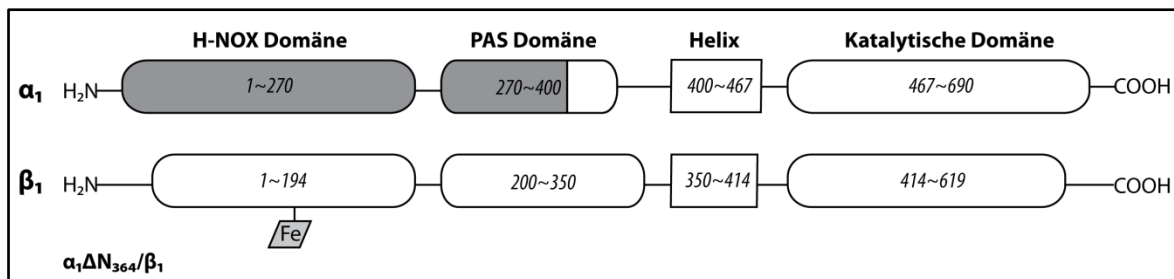
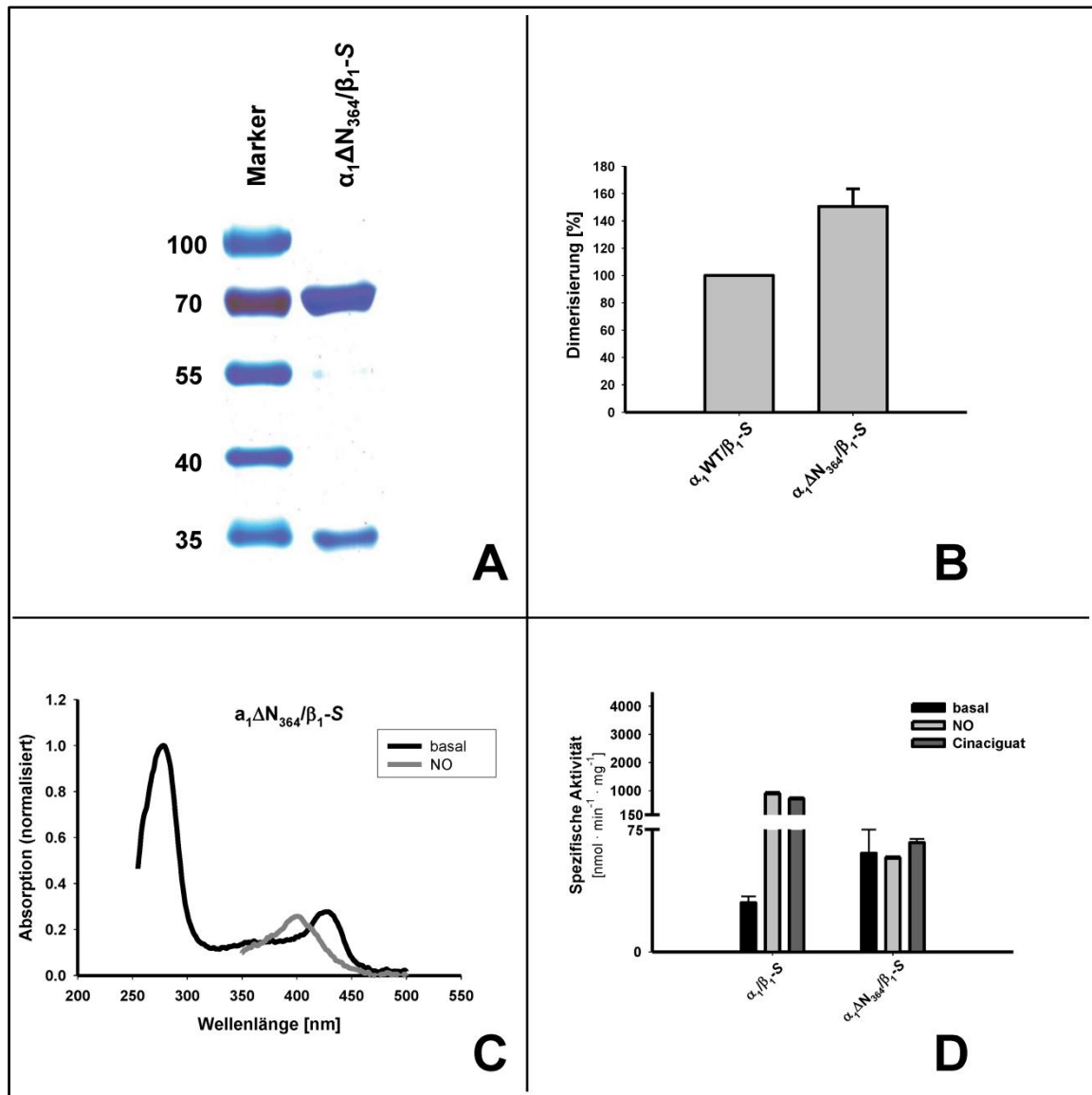


Abbildung 41

Visualisierung der $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ -Isoform (modifiziert nach DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009). Der Trunktion ist grau markiert. Zusätzlich ist die β_1 -Untereinheit dargestellt.

Zum Nachweis der Dimerisierung wurde die $\alpha_1\Delta N_{364}$ -Untereinheit mit β_1 -S koexprimiert und nachfolgend einer Anreinigung mittels Affinitätschromatographie (*Strep* Tag II/*Strep*-Tactin) durchgeführt (Abbildung 42A). Die Quantifizierung der Dimerisierung mittels Densitometrie ergab 150,6 % ($\pm 10,4$ %) bezogen auf den Wildtyp (Abbildung 42B). Folgte man hier der in 4.1.4 dargestellten Überlegung, dass bei einer stöchiometrischen Aussage das Molekulargewicht zu berücksichtigen wäre, so ergäbe sich für $\alpha_1\Delta N_{364}$ -Untereinheit eine relative Dimerisierung von 324,6 %. Wie schon Koglin und Behrends 2003 (KOGLIN AND BEHREND, 2003) zeigen konnten, bildet auch $\alpha_1\Delta N_{364}$ katalytisch aktive Heterodimere mit der β_1 -Untereinheit aus (Abbildung 42D), denen allerdings die Responsivität gegenüber NO (trotz eindeutiger Hämhaltigkeit; Abbildung 42C) und Cinaciguat fehlt. Im Unterschied zu der früheren Arbeit (KOGLIN AND BEHREND, 2003) wurde bei diesen Experimenten die Expression durch eine Optimierung der Kozak-Konsensus-Sequenz verstärkt (vgl. 3.2.5.5).

**Abbildung 42**

Untersuchungen zur $\alpha_1\Delta N_{364}$ -Untereinheit. A, Coomassie-gefärbtes Gel des angereinigten Heterodimers aus $\alpha_1\Delta N_{364}$ und β_1-S . Aufgetragen wurden 5 μ g. Entsprechend den Aminosäuresequenzen kalkuliertes Molekulargewicht: $\alpha_1\Delta N_{364}$, 36,0 kDa; β_1-S , 71,4 kDa. B, Densitometrische Analyse zum Grad der Dimerisierung im Vergleich zum Wildtyp. C, Spektroskopische Untersuchung der $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ -Isoform. D, Enzymaktivitätsbestimmung von Wildtyp verglichen mit der $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ -Isoform.

4.2.2 Einfluss einer analogen Deletion der H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit auf die Dimerisierung

Durch die vorhergehenden Befunde konnte als gesichert angenommen werden, dass eine weitgehende Deletion des Aminoterminus der α_1 -Untereinheit keinen negativen Einfluss auf die Ausbildung von Heterodimeren mit der β_1 -Untereinheit ausübt. Daher war es naheliegend, eine analoge aminoterminal Deletion bei der β_1 -Untereinheit

auszuführen, also die H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit zu entfernen (Abbildung 43).

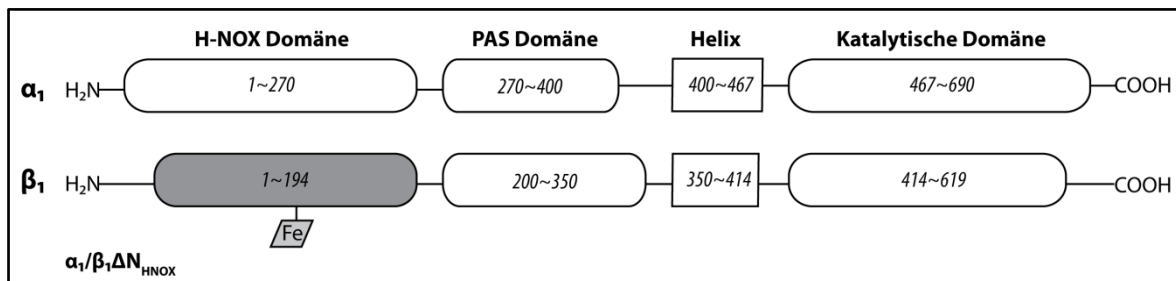
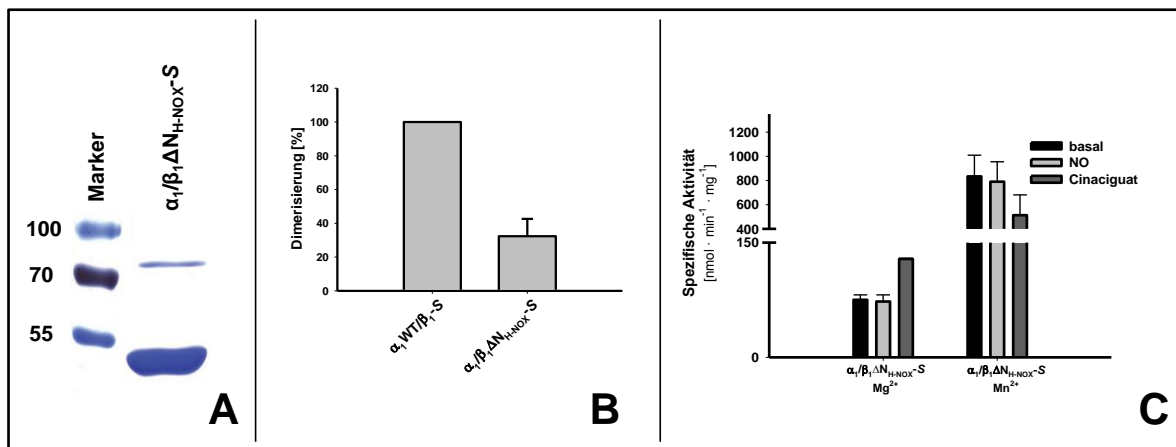


Abbildung 43

Visualisierung der $\alpha_1/\beta_1\Delta N_{H-NOX}$ -Isoform (modifiziert nach DERBYSHIRE AND MARLETTA, 2009). Die fehlende H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit ist grau markiert. Zusätzlich ist die α_1 -Untereinheit dargestellt.

Hier wurde wie zuvor der Nachweis der Dimerisierung mit Hilfe der Anreinigung über den *Strep* Tag II erbracht. Dazu wurde die α_1 WT-Untereinheit mit $\beta_1\Delta N_{H-NOX}$ -S koexprimiert und hiernach einer Affinitätschromatographie unterzogen (Abbildung 44A). Die densitometrische Auswertung ergab 32,4 % ($\pm 8,4$ %) Dimerisierung im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 44B). Bei Berücksichtigung des Molekulargewichtes (vgl. Überlegung unter 4.1.4) ergäbe sich eine relative Dimerisierung von 45,4 %. Erwartungsgemäß zeigt das Konstrukt keine Aktivierung durch NO und Cinaciguat, da es aufgrund der fehlenden H-NOX Domäne hämfrei ist und keine Bindungsdomäne für Cinaciguat bietet. Dementsprechend besitzt das Konstrukt nur basale enzymatische Aktivität. Zur näheren Untersuchung dieser basalen Aktivität wurden zusätzlich Aktivitätsbestimmungen in Gegenwart von 3 mM Mn^{2+} anstelle von 3 mM Mg^{2+} durchgeführt (Abbildung 44C).

**Abbildung 44**

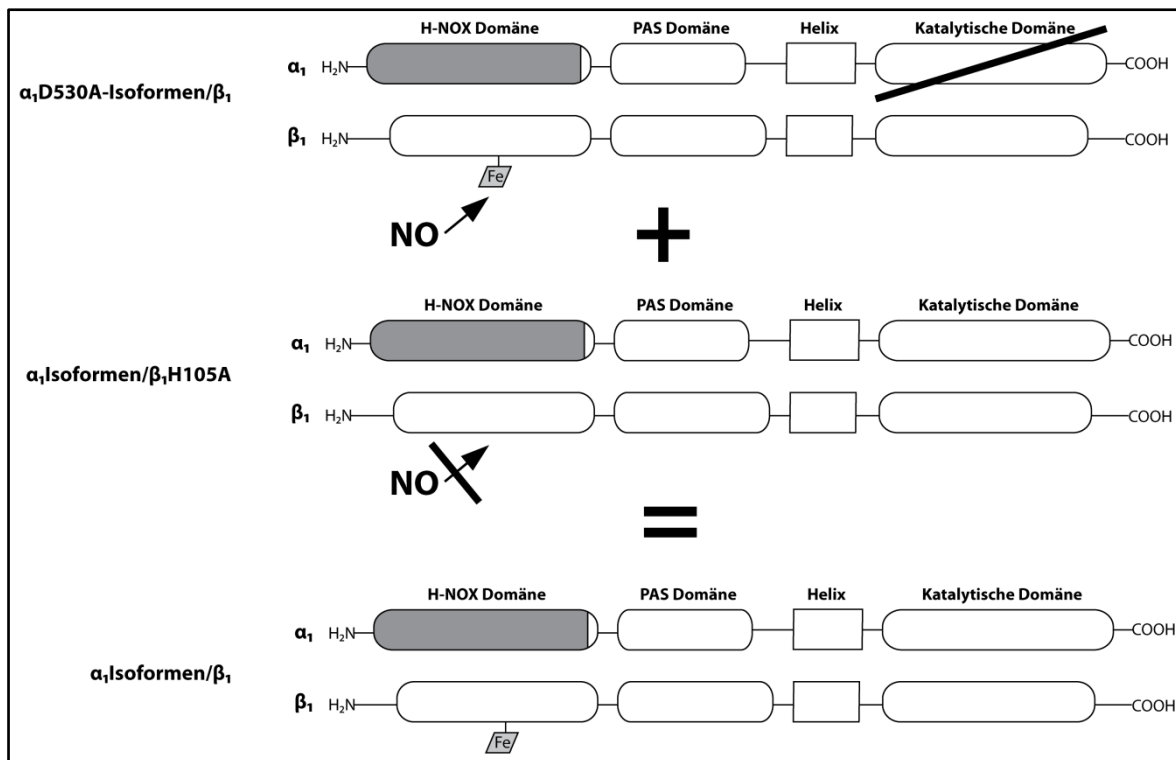
Untersuchungen zur β₁ΔNH-NOX-Untereinheit. A, Coomassie-gefärbtes Gel des angereinigten Heterodimers aus α₁ und β₁ΔNH-NOX-S. Aufgetragen wurden 5 µg. Entsprechend den Aminosäuresequenzen kalkuliertes Molekulargewicht: α₁WT, 77,6 kDa; β₁ΔNH-NOX-S, 50,9 kDa. B, Densitometrische Analyse zum Grad der Dimerisierung im Vergleich zum Wildtyp. C, Enzymaktivitätsbestimmung von Wildtyp verglichen mit der α₁/β₁ΔNH-NOX-S.

4.2.3 Untersuchung eines möglichen Austauschs zwischen Untereinheiten der NOsGC-Dimere

Zur Untersuchung der Frage, ob die Untereinheiten von NOsGC-Heterodimeren untereinander austauschbar sind, wurde ein katalytisch inaktives NOsGC-Konstrukt (α₁D530A/β₁-S) mit einem NO-unresponsiven Enzymkomplex (α₁-S/β₁H105A) inkubiert. Nach der Inkubation wurde mittels Enzymaktivitätsbestimmung untersucht, ob sich NO-responsive Heterodimere mit katalytischer Aktivität nachweisen ließen. Ein solcher Nachweis wäre als Beleg für einen stattgefundenen Austausch von einzelnen Untereinheiten zwischen den NOsGC-Heterodimeren zu werten gewesen.

Experimenteller Aufbau:

- α₁D530A/β₁-S katalytisch inaktiv, aber NO-responsiv
- α₁-S/β₁H105A katalytisch aktiv, aber NO-irresponsiv

**Abbildung 45**

Visualisierung des experimentellen Aufbaus zum Nachweis eines etwaigen Austauschs zwischen den Untereinheiten der NOsGC-Dimere.

Die beiden NOsGC-Konstrukte wurden mittels Affinitätschromatographie angereinigt und dann äquimolar in einem, die Bedingungen des Zellinneren imitierenden Puffers (Whole-Cell-Buffer) sowie einem ATP-regenerierenden System aus 6 mM ATP, 30 mM Creatinphosphat und 0,25 mg/ml (≈ 35 U/ml) Creatinkinase über Nacht inkubiert. Das ATP-regenerierende System sollte für etwaige energieverbrauchende Prozesse bei dem Austausch der Untereinheiten die notwendige Energie bereitstellen. Auch nach mehrfacher Wiederholung konnte mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes kein Austausch der Untereinheiten nachgewiesen werden, da keine durch NO-stimulierbare NOsGC Aktivität nachgewiesen werden konnte.

In einer früheren Master-Arbeit unserer Arbeitsgruppe (HAASE, 2006) wurde die Vermutung geäußert, dass der Aminotерminus der α_1 -Untereinheit einen Einfluss auf die Dimerisierung haben könne. Daher sollte untersucht werden, ob der oben beschriebene experimentelle Ansatz beim Einsatz einer aminoterminal verkürzten Variante von α_1 erfolgreich wäre.

Hierbei wurden folgende NOsGC-Konstrukte eingesetzt:

- $\alpha_1\Delta N_{259}D530A/\beta_1-S$ katalytisch inaktiv, aber NO-responsiv
- α_1-S/β_1H105A katalytisch aktiv, aber NO-irresponsiv

Jedoch konnte auch bei dieser Variation nicht der Nachweis erbracht werden, dass es zu einem interheterodimeren Austausch von einzelnen Untereinheiten kommt.

4.3 Untersuchungen der Dimerisierung der NOsGC-Untereinheiten in einem prokaryotischen System oder in zellfreien Expressionssystemen

Die vorangegangenen Ergebnisse dieser Arbeit wurden alle mit in eukaryotischen Zellen exprimierter NOsGC erzielt. Um der Dimerisierung zugrunde liegende Prinzipien zu untersuchen, wurde die Expression der NOsGC zum einen in *E. coli* (Prokaryot) und zum anderen in zwei zellfrei arbeitenden Expressionssystemen (prokaryotisch und eukaryotisch) durchgeführt. Die Expression der NOsGC-Konstrukte konnte bei allen drei Systemen mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Der Nachweise der Dimerisierung sollte mit Hilfe des Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgen, da schon 50 ng Enzym (vgl. 3.8) ausreichen, um eindeutige Ergebnisse zu erzielen. Es zeigte sich jedoch, dass keines der drei Systeme es vermochte, die NOsGC enzymatisch aktiv zu exprimieren. Daher wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, Faktoren zu identifizieren, deren Zusatz die Expression von funktionstüchtiger NOsGC in diesem System erlauben würde.

4.3.1 Untersuchung der Dimerisierung in *E. coli*

Der NOsGC-Komplex aus der α_1 - und der β_1 -Untereinheit wurde mit einem bicistronischen Vektor (vgl. 3.2.5.19) wie unter 3.3.3 beschrieben in *E. coli* exprimiert. Das rekombinant gebildete Protein wurde wie unter 3.3.5.2 beschrieben gewonnen und die Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheiten wurde durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 46). Der Hämgehalt aus *E. coli* gewonnener NOsGC ist bekanntermaßen verschwindend gering (LAFFLY ET AL., 2009). Unter basalen Bedingungen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Unter NO-stimulierten Bedingungen (100 μ M DEA/NO) konnte hingegen eine spezifische Aktivität von $1,3 (\pm 0,5) \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ nachgewiesen werden. Diese war geringfügig höher als bei der Expression der NOsGC in *E. coli* aus der Studie von Laffly et al. (LAFFLY ET AL., 2009). Die Enzymaktivität war aber um drei Zehnerpotenzen niedriger als bei der Expression des gleichen NOsGC-Komplexes in Sf9-Zellen (vgl. 4.1.4).

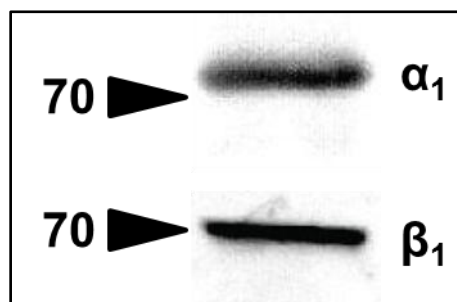


Abbildung 46

Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Expression der beiden NOsGC-Untereinheiten. Es wurde pro Lane 1 μ g aufgetragen.

Um auszuschließen, dass die fehlende Enzymaktivität mit einer nicht erfolgten Dimerisierung der beiden einzelnen Untereinheiten zu begründen ist, wurde ein Fusionskonstrukt aus der β_1 - und der α_1 -Untereinheit (vgl. 3.2.5.20) exprimiert. Mit unserer 2010 veröffentlichten Publikation (HAASE ET AL., 2010a) konnten wir zeigen, dass es möglich ist die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit zu fusionieren, ohne die grundsätzlichen Eigenschaften zu verändern. Nach der Expression des Fusionskonstrukts in *E. coli* war keine Aktivität detektierbar, so dass durch diesen Ansatz sogar die geringe Enzymaktivität des Heterodimers verloren ging.

4.3.2 Untersuchung der Dimerisierung in zellfreien Expressionssystemen

4.3.2.1 Untersuchung der Dimerisierung im EasyXpress® Protein Synthese Reagenziensystem

Dem Protokoll der Firma *Qiagen* entsprechend wurde die Expression der NOsGC (α_1/β_1 -S) durchgeführt, wobei die unter 3.2.5.21 und 3.2.5.22 beschriebenen DNA-Matrizen Anwendung fanden. Auch hier erfolgte der Nachweis der Expression beider Untereinheiten mittels Western-Blot-Analyse (Abbildung 47). Enzymaktivität ließ sich jedoch nicht nachweisen.

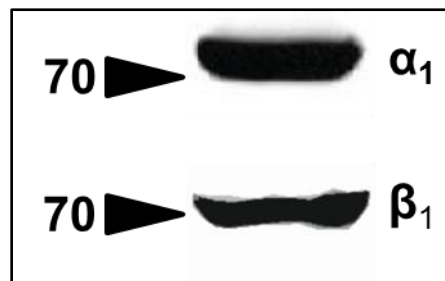
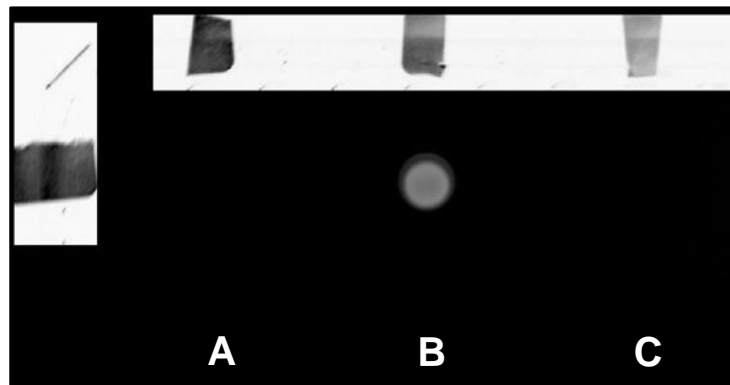


Abbildung 47

Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Expression der beiden NOsGC-Untereinheiten. Aufgetragen wurden 10 μ l des Expressionsansatzes je Spur.

Die vom Hersteller vorgesehene Kontrolle ist die Expression einer Luciferase (HANSELLE). Um die enzymatische Aktivität dieses Enzyms zu testen, wurde der Kontrollansatz in zwei Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgeteilt. Einem der beiden Vertiefungen wurde Luciferase-Substrat (Promega, Madison, USA) zugesetzt (Abbildung 48B). Der anderen Vertiefung wurde lediglich Reinstwasser zugesetzt (Abbildung 48A). Als Negativ-Kontrolle diente das Luciferase-Substrat alleine (Abbildung 48C). Die so vorbereitete Mikrotiterplatte wurde in einer Dunkelkammer mittels CCD-Kamera auf Lichtemissionen untersucht (Abbildung 48). Die Vertiefung mit dem Kontrollansatz leuchtet in Gegenwart des Substrats eindeutig. Die Bildung enzymatisch aktiver Luciferase in dem EasyXpress® System lässt sich so belegen.

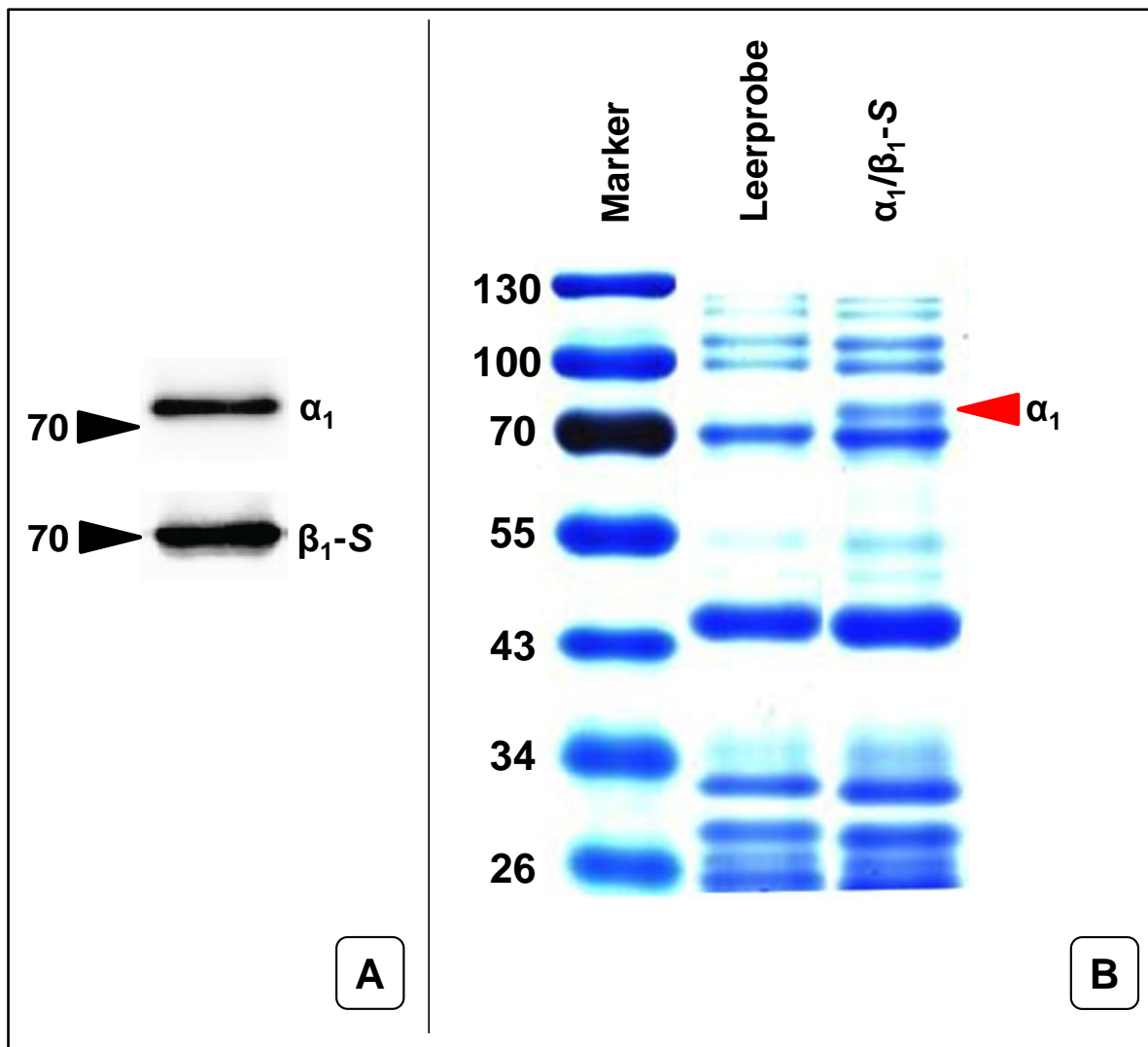
**Abbildung 48**

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Mikrotiterplatte zur Überprüfung der Enzymaktivität der Luciferase. A, Luciferase alleine; B, Luciferase und Luciferase-Substrat; C, Luciferase-Substrat alleine.

4.3.2.2 Untersuchung der Dimerisierung im PURExpress® *In Vitro* Protein Synthese Reagenziensystem

Für die Expression der NOsGC im prokaryotischen zellfreien System der Firma *New England Biolabs*, wurde das unter 3.2.5.19 beschriebene Konstrukt (α_1/β_1 -S) entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Durch die Begrenzung der Komponenten dieses Systems auf die für die Transkription und Translation notwendigen Bestandteile bei diesem System, konnte die Expression der NOsGC, außer durch Western-Blot-Analyse, zum Teil (α_1 -Untereinheit) sogar schon mittels Coomassie-gefärbter Gele der SDS-PAGE sichtbar gemacht werden (Abbildung 49). Die Bande der β_1 -Untereinheit wird von einem systemimmanenten Protein überlagert und ist daher nicht als eigene abgrenzbare Bande auf dem Coomassie-Gel zu erkennen, wenngleich eine Zunahme der Intensität dieser Bande zu sehen ist. Die enzymatische Aktivität des Enzyms konnte nicht nachgewiesen werden.

Ebenso wie bei der Untersuchung in *E. coli* wurde auch in diesem zellfreien System die Expression des Fusionskonstrukts $\beta_1\alpha_1$ -S (vgl. 3.2.5.20) durchgeführt. So sollte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Enzymaktivität nur in einer nicht erfolgten Dimerisierung zu begründen wäre. Es konnte allerdings auch mit diesem qua Nukleotidsequenz fusionierten („dimerisierten“) Enzym keinerlei Aktivität nachgewiesen werden.

**Abbildung 49**

SDS-PAGE zum Nachweis der Expression der beiden NOsGC-Untereinheiten. A, Western-Blot-Analyse. B, Coomassie-gefärbtes Gel; mit rotem Pfeil markierte Bande entspricht der α_1 -Bande. Aufgetragen wurden 5 μl des Expressionsansatzes je Spur.

4.3.3 Identifizierung etwaiger Supplemente für die zellfreie Expression

Da sowohl bei der Expression der NOsGC in *E. coli*, als auch in beiden zellfreien Expressionssystemen keine signifikante enzymatische Aktivität nachweisbar war, wurde versucht für die Expression einer funktionalen NOsGC notwendige Faktoren zu identifizieren. Die Zugabe dieser Faktoren sollten das PURExpress® *In Vitro* Protein Synthese Reagenziensystem befähigen, eine funktionsfähige NOsGC mit enzymatischer Aktivität zu exprimieren. Das PURExpress® System bot sich für die Untersuchung notwendiger Zusätze an, da es aus rein rekombinant hergestellten Proteinen besteht und somit eine exakt definierte Zusammensetzung aufweist.

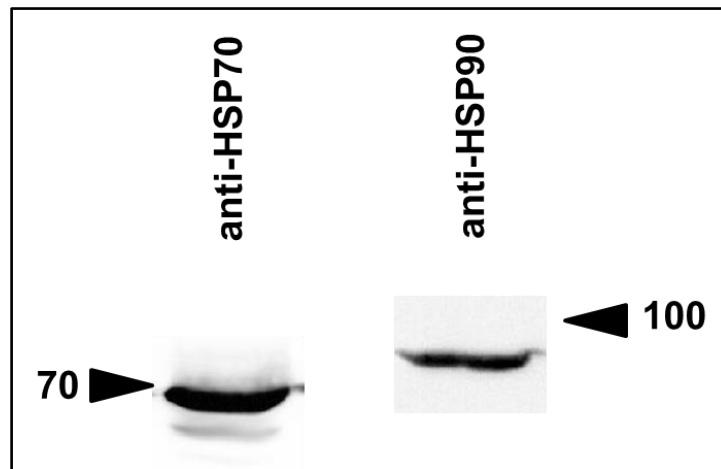
Zunächst wurde versucht dem zellfreien System die Expression funktionaler NOsGC durch den Zusatz von Lysat aus Sf9- oder HEK-293 Zellen zu ermöglichen. Dieser Ansatz war naheliegend, wenn man berücksichtigt, dass die Dimerisierung der NOsGC in den intakten Zellen dieser beiden Zelllinien leicht gelingt. Somit bestand die Vermutung, dass auch die Lysate die für die Dimerisierung notwendigen Faktoren böten und deren Zusatz zum zellfreien System die Expression funktionstüchtiger NOsGC ermöglichen würde. Um die Bedingungen, wie sie im Inneren einer Zelle vorherrschen, nachzuahmen, wurden die Lysate der beiden Zelllinie mit dem Whole-Cell-Buffer angesetzt, welcher bezüglich pH-Wert und Salzkonzentration diesem entspricht. Der Zusatz der Lysate beeinflusste die Expression der NOsGC-Untereinheiten nicht, wie sich mittels Western-Blot-Analyse zeigen ließ. Allerdings konnte auch unter diesen Bedingungen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Aus einer 2010 veröffentlichten Publikation unserer Arbeitsgruppe von Haase et al. (HAASE ET AL., 2010b) war bekannt, dass es im Großhirn adulter Ratten weniger α_2/β_1 -Heterodimere gibt als bei Jungtieren. Ausgehend von dieser Erkenntnis, wurde dem Expressionssystem Großhirn-Lysat (im Whole-Cell-Buffer) adulter und neonataler Ratten zugesetzt. Auch hier konnte keine signifikante Beeinflussung der Expression der beiden NOsGC-Untereinheiten mittels Western-Blot gezeigt werden. Jedoch ließ sich erneut keinerlei enzymatische Aktivität nachweisen.

Die Firma *New England Biolabs* offeriert einen zum Expressionssystem passenden Zusatz, welcher die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen während der Expression unterstützen soll (PURExpress® Disulfide Bond Enhancer). In dieser Arbeit wurde entsprechend der Zusatz des Enzyms Protein Disulfid Isomerase (PDI) ausgetestet. Es gibt in der Literatur Hinweise auf die Existenz von Disulfidbrücken innerhalb der Struktur der NOsGC (SAYED ET AL., 2007). Auch nach Zugabe dieses Enzyms wurde keine Enzymaktivität nachgewiesen, trotz nicht beeinflusster Expression, die mittels Western-Blot-Analyse überprüft worden war.

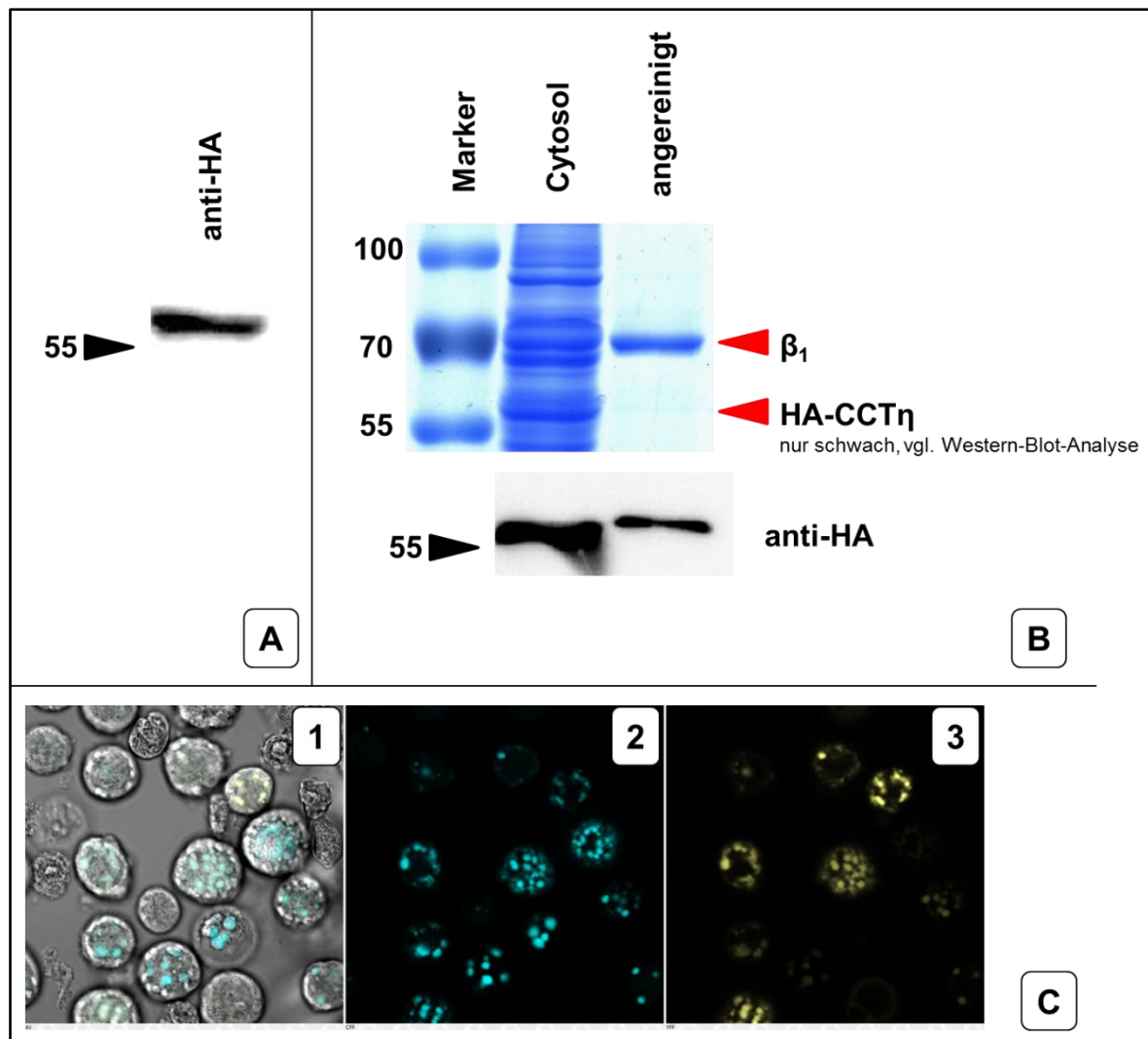
Aus der Literatur war bekannt, dass die Hitze-Schock-Proteine HSP70 (BALASHOVA ET AL., 2005) und HSP90 (PAPAPETROPOULOS ET AL., 2005; NEDVETSKY ET AL., 2008) Interaktionspartner der NOsGC darstellen. Eigene Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens der beiden Proteine in HEK-293 Zellen (Abbildung 50) erhärteten die Möglichkeit der Interaktion. Somit lag die Vermutung nahe, dass der Zusatz von gereinigtem HSP70 und / oder HSP90 (beide: Sigma-Aldrich) hilfreich für die zellfreie Expression der NOsGC sein könnte. Beide Hitze-Schock-Proteine sind Chaperone⁴⁸ und als solche an der korrekten Faltung von Polypeptiden beteiligt. Jedoch führte auch der Zusatz dieser beiden Proteine nicht zu einer messbaren Enzymaktivität. Die Expression der NOsGC-Untereinheiten wurde nicht beeinflusst.

⁴⁸ *chaperon*; engl. Anstandsdame
(Langenscheidt Online-Wörterbücher, Großwörterbuch Englisch, 2011)
In den Lebenswissenschaften wird der Ausdruck für Proteine gebraucht, welche an der Faltung von anderen Proteinen beteiligt sind.

**Abbildung 50**

Western-Blot-Analyse von Cytosol aus HEK-293 Zellen. Es wurden 50 µg Gesamtprotein je Lane aufgetragen.

In der Literatur wird ein weiteres Chaperon benannt, welches mit der β_1 -Untereinheit der NOsGC zu interagieren vermag (HANAFY ET AL., 2004). Bei dem von den Autoren identifizierten Protein handelt es sich um die siebte Untereinheit des Chaperonin Containing T-Complex Polypeptid, dem CCT η . Das Protein ist Bestandteil eines Heterooktamers, welches einen Ring bildet, wobei zwei dieser Ringe miteinander das funktionstüchtige Chaperon ausbilden (VALPUESTA ET AL., 2002). Selbst durchgeführte Untersuchungen belegen eine Interaktion zwischen der NOsGC und dem CCT η . So konnte mittels Immunpräzipitation die Interaktion zwischen der β_1 -Untereinheit und CCT η (HA-CCT η) gezeigt werden (Abbildung 51A). Diese Interaktion wurde untermauert durch die Tatsache, dass es möglich war CCT η nach einer Coinfektion von β_1 -S und CCT η (HA-CCT) in Sf9-Zellen nach der Anreinigung über die *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie mittels Western-Blot-Analyse nachzuweisen (Abbildung 51B). Dies kann als Hinweis auf eine recht starke Interaktion zwischen den beiden Proteinen gewertet werden, da selbst die während der Anreinigung vorherrschenden Scherkräfte die Interaktion nicht zu lösen vermochten. Neben diesen proteinbiochemischen Nachweisen erfolgte auch die Untersuchung einer möglichen Kolokalisation der beiden Proteine (β_1 und CCT η), indem diese mit Fluoreszenzproteinen markiert wurden (β_1 -EYFP und ECFP-HA-CCT η) und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht wurden (Abbildung 51C). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen eine fast ausnahmslose Kolokalisation der beiden Proteine.

**Abbildung 51**

Untersuchungen zur Interaktion der β_1 -Untereinheit der NOSGC mit CCT η . A, Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation; die Präzipitation erfolgte mit dem anti- β_1 -Antikörper (Sigma-Aldrich). B, Anreicherung von β_1 -S, wobei HA-CCT η koexprimiert worden war; oben: Coomassie-gefärbtes Gel der SDS-PAGE; unten: Western-Blot-Analyse, die zeigt, dass CCT η zusammen mit β_1 -S angereichert wurde. 50 μ g Cytosol und 1 μ g angereinigtes Protein wurden aufgetragen. C, Aufnahme von HEK-293 Zellen, die mit β_1 -EYFP und CFP-HA-CCT η cotransfiziert worden waren; 1: Mischbild aus Durchlicht, CFP- und YFP-Kanal; 2: CFP-Kanal; 3: YFP-Kanal.

Auf diesen Ergebnissen beruhend wurde HA-CCT η aus Sf9-Zellen mit Hilfe der anti-HA-Affinity-Matrix (Roche) angereinigt (Abbildung 52) und dem PURExpress[®] System zugesetzt. Wiederum war es trotz fehlender Beeinflussung der Expression der NOSGC nicht möglich Enzymaktivität nachzuweisen.

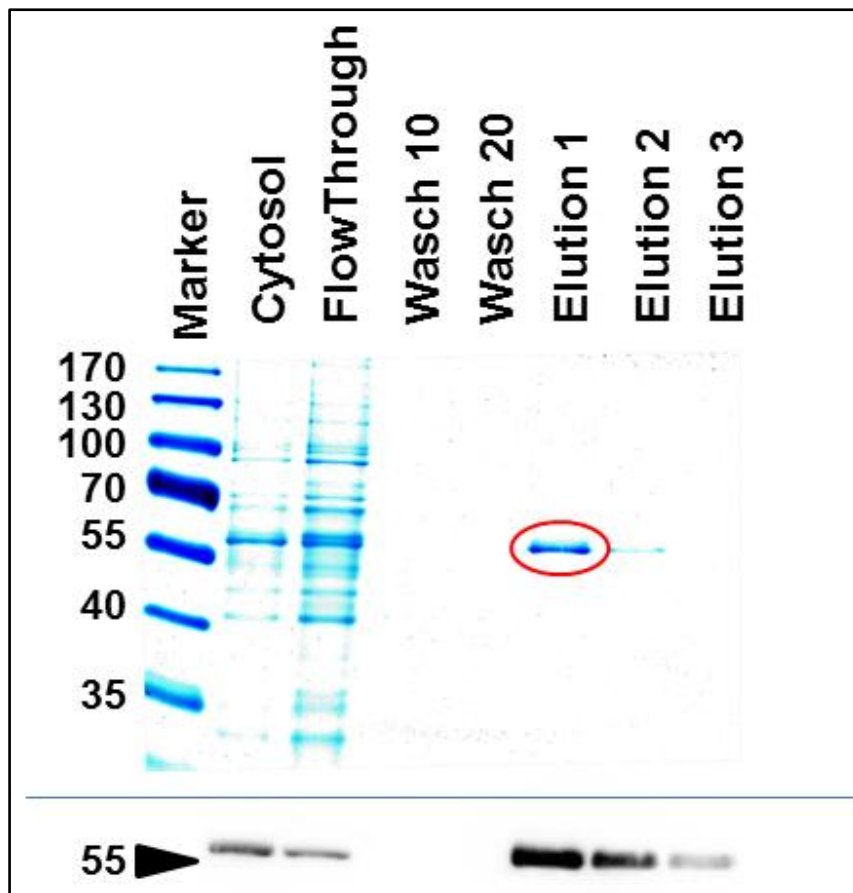


Abbildung 52

Anreinigung von HA-CCT η mittels Anti-HA-Affinity-Matrix. Im oberen Teil ist das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE gezeigt und im unteren Teil der dazugehörigen Western-Blot mit dem anti-HA Antikörper.

5. Diskussion

5.1 Entwicklung einer neuen Ein-Schritt-Anreinigung für die NOsGC

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Anreinigungsmethode führt zu einem Protein mit 95%iger Reinheit. Dabei beträgt die Ausbeute 25 % bei nur einem Anreinigungsschritt. Pro Liter S9-Zellkultur lassen sich so 1 mg gereinigte NOsGC gewinnen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Anreinigungen zur Untersuchung der Dimerisierung sind mit Hilfe eines carboxyterminalen *Strep* Tag II der β_1 -Untereinheit erfolgt. Die Coomassie-gefärbten Gele (z.B. Abbildung 32) zeigen eine stärkere Bandenintensität für die β_1 -Untereinheit gegenüber der α_1 -Untereinheit. Dies lässt sich mit der Bildung von β_1 -Homodimeren erklären: *Zabel* et al. zeigten schon 1999, dass die Untereinheiten der NOsGC bei Koexpression auch Homodimere bilden (ZABEL ET AL., 1999). *Wagner* et al. zeigten, dass die Stabilität der β_1 -Homodimere hoch ist und konnten die Homodimerbildung der instabilen α_1 -Untereinheit nicht bestätigen (WAGNER ET AL., 2005). Die Anreinigung über einen carboxyterminalen *Strep* Tag II der α_1 -Untereinheit führt zu vergleichbaren Bandenintensitäten für die α_1 - und β_1 -Untereinheit (vgl. Abbildung 28). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Heterodimerisierung von verschiedenen Varianten der α_1 -Untereinheit untersucht werden sollte, erfolgte die Anreinigung über die β_1 -Untereinheit. Dies erlaubte auch einen besseren Vergleich mit den Daten von *Wagner* et al. (WAGNER ET AL., 2005).

Beinhaltet die Anreinigung der NOsGC einen Anteil an β_1 -Homodimeren, so wird dieser bei der Bestimmung der Proteinkonzentration miterfasst. Dies führt zu einer geringeren Konzentration an katalytisch aktiven Heterodimeren, die bei der Messung der Enzymaktivität eingesetzt werden. Es resultiert eine geringere spezifische Enzymaktivität in der Gegenwart von β_1 -Homodimeren ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Dies erklärt, warum die spezifische Enzymaktivität des in dieser Arbeit untersuchten NOsGC-Wildtyps aus α_1/β_1 -S mit etwa $6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ vergleichsweise gering ist (vgl. Tabelle 7).

In unserer Publikation von 2010 (HAASE ET AL., 2010a) wurde ein sehr ähnliches Anreinigungsprotokoll verwendet, wie das hier beschriebene. Allerdings verwendeten wir für diese Anreinigungen mit dem *Strep* Tag II fusionierte α -Untereinheiten. So war es uns möglich die β_1 -Homodimere während der Anreinigung abzutrennen. Die so erhaltenen NOsGC-Isoformen weisen eine spezifische Enzymaktivität von etwa $20 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ auf und sind damit ähnlich aktiv wie Enzym, welches durch andere Anreinigungsprotokolle gewonnen wurde (vgl. Tabelle 7).

Im Jahr 2009 wurde von Mitarbeitern der Firma *Pfizer* (EMMONS ET AL., 2009) ein großes Anreinigungsprotokoll veröffentlicht, bei dem aus 100 l *Sf9*-Zellen in einem vierstufigen Prozess 26 mg NOsGC isoliert werden konnten. Dies entspricht einer Ausbeute von 13 %. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielte Ausbeute ist etwa doppelt so hoch und bedarf nur eines Schrittes. Das von *Emmons* et al. gewählte Protokoll enthält unter anderem eine Ni^{2+} -NTA⁴⁹-Affinitätschromatographie, die den Histidin-Tag zur Anreinigung nutzt. Zur Elution der Histidin-getaggten Proteine wird meist Imidazol verwendet, die Seitenkettenfunktion der Aminosäure Histidin. Der Histidin-Tag ist sehr weit verbreitet (TERPE, 2003; ARNAU ET AL., 2006). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit zeigte sich schnell, dass die Elution mit dem Histidin-Analogon Imidazol die Hämhaltigkeit der NOsGC reduziert. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit stattdessen das *Strep* Tag II System verwendet.

⁴⁹ NTA = Nitrilotriessigsäure; ein starker Chelatbildner für Ni^{2+} , aber auch andere Übergangsmetalle.

Diskussion

Tabelle 7

Übersicht verschiedener Anreinigungsprotokolle der NOsGC α_1/β_1 -Isoform aus dem S9-Expressionssystem.

Ausbeute	Spezifische Aktivität (NO-stimuliert) [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	Methode	Literaturangabe
0,2 mg aus 800 mg Zellsediment	4	1. Anionenaustauscher- chromatographie	FOERSTER ET AL., 1996
0,07 mg aus 1,8 l	28	1. Anionenaustauscher- chromatographie 2. Adsorptions- chromatographie 3. Blue-Sepharose- chromatographie	KOGLIN AND BEHREND, 2003
4,8 mg aus 3 l	18	1. Anionenaustauscher- chromatographie 2. Histidin-Affinitäts- chromatographie 3. Anionenaustauscher- chromatographie	MARTIN ET AL., 2005
26 mg aus 100 l	11	1. Anionenaustauscher- chromatographie 2. Histidin-Affinitäts- chromatographie 3. Anionenaustauscher- chromatographie 4. GTP-Agarose- Affinitätschromato- graphie	EMMONS ET AL., 2009
1 mg aus 1 l	20	1. Strep-Tactin- Affinitätschromato- graphie 2. Anionenaustauscher- chromatographie	HAASE ET AL., 2010a
1 mg aus 1 l	6	1. Strep-Tactin- Affinitätschromato- graphie	Protokoll dieser Arbeit & KRAEHLING ET AL., 2011

Verglichen mit anderen bisher veröffentlichten Anreinigungen von NOsGC aus Sf9-Zellen (FOERSTER ET AL., 1996; KOGLIN AND BEHREND, 2003; MARTIN ET AL., 2005; EMMONS ET AL., 2009) ist das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokoll vergleichbar (Tabelle 7). Es hat aber den entscheidenden Vorteil, dass nur eine Säulenchromatographie zu einem hochgereinigten Protein führt. Ein solches Protokoll erlaubt die Untersuchung einer Reihe von NOsGC-Isoformen und -Varianten mit vertretbarem Arbeitsaufwand.

5.2 Untersuchungen zu C- α_1

Das in Zellen vielfältig anzutreffende Prinzip der Dimerisierung oder Oligomerisierung von Proteinen (SMOCK AND GIERASCH, 2009) erlaubt den Zellen mit einem begrenzten Repertoire an Proteinen eine große Vielfalt an Funktionen zu verwirklichen. Durch die höhere Ordnung von Proteinen können diese stabilisiert werden, da die Oberfläche eines Dimers kleiner ist als die der beiden Monomere zusammen. Zum anderen kann die Spezifität erhöht werden oder die Enzymaktivität reguliert werden. Interessanterweise vermitteln nur ein Drittel der Enzyme ihre Funktion als Monomer, die Mehrheit bildet Di-, Oligo- oder Multimere, um katalytisch aktiv zu sein (MARIANAYAGAM ET AL., 2004).

Schon früh war klar, dass die NOsGC ihre Funktion als Heterodimer vermittelt (KAMISAKI ET AL., 1986). Diverse Arbeitsgruppen bestätigten im Laufe der folgenden Jahre, dass die NOsGC zur Erlangung katalytischer Aktivität dimerisieren muss (HARTENECK ET AL., 1990; BUECHLER ET AL., 1991; ZABEL ET AL., 1999). Sharina et al. wiesen in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2008 eine humane Spleißvariante der α_1 -Untereinheit nach (SHARINA ET AL., 2008). Diese Spleißvariante codiert auf cDNA-Ebene für eine aminoterminal um 235 Aminosäuren verkürzte α_1 -Untereinheit. Aus einer früheren Dissertation unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass sich die $\alpha_1\Delta N_{236}$ -Untereinheit in der Western-Blot-Analyse nicht von der $\alpha_1\Delta N_{259}$ -Untereinheit unterscheidet (KOGLIN, 2002). Dies spricht dafür, dass statt des Startcodons an der Position 236 erst das nächst folgende Startcodon (259) als Translationsbeginn genutzt wird. Der Versuch, diesen Befund mit Hilfe von Computerprogrammen zu untermauern, führte zu keinem klaren Ergebnis. Dies scheint allerdings nicht ungewöhnlich zu sein (ZENG ET AL., 2009). Daher nehmen wir an, dass die

Spleißvariante der α_1 -Untereinheit um 258 Aminosäuren verkürzt ist: Durch das alternative Spleißen gehen 235 Aminosäuren verloren. Darüber hinaus ist die Spleißvariante aufgrund des alternativen Translationsbeginns gegenüber dem theoretisch vorhergesagten Produkts um weitere 23 Aminosäuren verkürzt.

Dem alternativen Spleißen unterliegen über 90 % aller Transkripte humaner Gene (WANG ET AL., 2008; CARNINCI, 2009). Daher ist es nicht überraschend, dass auch die Gene der NOsGC alternativ gespleißt werden. Bereits 1991 wurden zwei verkürzte Untereinheiten der β_1 -Untereinheit der NOsGC beschrieben (CHHAJLANI ET AL., 1991). 1995 veröffentlichten *Behrends et al.* (BEHRENDT ET AL., 1995) die Beschreibung einer um 31 Aminosäuren erweiterten Untereinheit der α_2 -Untereinheit (α_{2i} ; $\alpha_{2612\Omega 31}$) der NOsGC, welche dominant negativ wirkt. Im Jahr 2006 konnte gezeigt werden, dass ebendiese α_{2i} -Untereinheit in der Adenohypophyse von Ratten durch die Applikation von 17β -Estradiol, dem wichtigsten weiblichen Sexualhormon, vermehrt gebildet wird (CABILLA ET AL., 2006). Die Arbeit zeigt die Bedeutung der Östrogene für die Regulation des NO/NOsGC/cGMP-Signalweges. Neben *Sharina et al.* wiesen auch *Ritter et al.* drei Spleißvarianten der α_1 -Untereinheit nach, wobei zwei davon zu einer um 235 Aminosäuren verkürzten α_1 -Untereinheit führen (RITTER ET AL., 2000). Nach den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe würde aber vermutlich auch bei den durch *Ritter et al.* beschriebenen Konstrukten eine um 258 Aminosäuren verkürzte Untereinheit entstehen. Auch hier träte noch zusätzlich der schon oben beschriebene Translationseffekt auf. *Ritter et al.* bestimmten die NOsGC-Aktivität in Lymphozyten und konnten zeigen, dass Zellen, die vornehmlich eine C- α_1 -ähnliche Spleißvariante bilden, eine geringere Enzymaktivität aufweisen als Zellen mit Wildtyp-NOsGC (RITTER ET AL., 2000). Demgegenüber war in der Studie von *Sharina et al.* kein signifikanter Unterschied der Enzymaktivitäten zwischen α_1/β_1 - und C- α_1/β_1 -exprimierenden BE2-Zellen festzustellen (SHARINA ET AL., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde sogar eine gesteigerte Enzymaktivität der C- α_1/β_1 - gegenüber der α_1/β_1 -Isoform nachgewiesen.

Wagner et al. beschrieben in einer wenige Jahre zuvor veröffentlichten Arbeit (WAGNER ET AL., 2005), dass die Aminosäuren 61-128 essentiell für die Heterodimerisierung seien (vgl. Abbildung 11). Die Untersuchungen von *Sharina et*

al. mittels Immunpräzipitation und Enzymaktivitätsbestimmungen sprachen hingegen für eine Dimerisierung der C- α_1 -Untereinheit, einer aminoterminal um 258 Aminosäuren verkürzten Variante der α_1 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit (SHARINA ET AL., 2008). Da in der Literatur uneinheitliche Beschreibungen über die Bedeutung des Aminoterminus der α_1 -Untereinheit existieren, sollte diese Arbeit Klarheit darüber schaffen, ob das C- α_1 -Protein fähig ist mit der β_1 -Untereinheit ein funktionstüchtiges Heterodimer auszubilden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein von der Enzymaktivität unabhängiges Anreinigungsprotokoll genutzt (vgl. 4.1.3), um die Dimerisierung eindeutig belegen zu können. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dimerisiert das C- α_1 -Protein mit der β_1 -Untereinheit und zeigt katalytische Aktivität. Um auch die Dimerisierung der aminoterminal trunkierten Variante der α_1 -Untereinheit in lebenden Zellen nachzuweisen und um ein von der Anreinigung unabhängiges Ergebnis zu erhalten, wurde mittels FLIM-FRET versucht die Dimerisierung *in vivo* nachzuweisen. Auch dies gelang mit einem eindeutigen Resultat, so dass als gesichert angenommen werden kann, dass die ersten 258 Aminosäuren der α_1 -Untereinheit keinen (negativen) Einfluss auf die Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit besitzen.

Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die zuvor veröffentlichten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe: *Koglin* und *Behrends* konnten schon 2003 zeigen, dass eine entsprechende Deletion aminoterminaler Aminosäuren weder die Dimerisierung noch die katalytische Aktivität beeinflusst (KOGLIN AND BEHREND, 2003). Zu ganz ähnlichen Ergebnissen kamen auch *Shiga* und *Suzuki*, welche die Dimerisierung der Guanylyl-Cyclase des Japanischen Reiskärpfings (*Oryzias latipes*) untersuchten und nachwiesen, dass die Deletion der ersten 272 Aminosäuren (humane Nummerierung) keinen Einfluss auf die Dimerisierung und katalytische Aktivität hat (SHIGA AND SUZUKI, 2005). Auch *Rothkegel* et al. zeigten, dass die ersten 363 Aminosäuren (humane Nummerierung) der α_1 -Untereinheit nicht an der Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit beteiligt sind (ROTHKEGEL ET AL., 2007).

Sharin et al. (SHARIN ET AL., 2011) konnten mit Hilfe der Immunhistochemie sowohl eine diffuse, als auch filamentöse, subzelluläre Lokalisation der α_1 -Untereinheit nachweisen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionen von

fluoreszenzmarkierten α_1 -Untereinheiten zeigten ein ganz ähnliches Ergebnis. Die α_1 -Untereinheit weist eine cytosolische Verteilung auf, wohingegen das C- α_1 -Protein eher perinukleär lokalisiert ist. Diese perinukleäre Lokalisation der C- α_1 -Untereinheit entsprach der subzellulären Lokalisation der Hämoxygenase-1 (HO-1). Die HO-1 kann als Organellmarker für das endoplasmatische Retikulum (ER) genutzt werden (MAINES, 1988). Aufgrund der ähnlichen Verteilung der C- α_1 -Untereinheit und der Hämoxygenase-1 scheint das C- α_1 -Protein am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert zu sein. Dies kann als Hinweis für die Bedeutung des ERs für die Häminsertion in die NOsGC gedeutet werden. Die Arbeitsgruppe um *Hamza* postuliert, dass das endoplasmatische Retikulum bei dem Hämeinbau in Apoproteine von besonderer Bedeutung sei (HAMZA, 2006; SCHULTZ ET AL., 2010).

Sharina et al. (SHARINA ET AL., 2008) wiesen eine erhöhte Stabilität des C- α_1 -Proteins gegenüber dem Oxidans ODQ nach und sehen darin eine mögliche physiologische Adaption an Situationen, in denen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Außerdem spekulieren die Autoren, dass NOsGC-Aktivatoren wie Cinaciguat möglicherweise nur auf C- α_1/β_1 -Heterodimere wirken, da der Wildtyp unter oxidativen Bedingungen bereits proteasomal degradiert sei. Die Fusion der beiden α_1 -Varianten mit dem Redoxsensor Grx1-roGFP2 zeigt, dass sich diese nicht nur in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden, sondern auch dass sie sich in unterschiedlichen Redox-Milieus befinden. Der Wildtyp ist in einer reduzierteren Umgebung lokalisiert als das C- α_1 -Protein.

Da die α_1 -Untereinheit und das C- α_1 -Protein ein unterschiedliches Verhalten in Abwesenheit der β_1 -Untereinheit zeigen, könnte dies auf unterschiedliche Funktionen der beiden Proteine hindeuten. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass auch die einzelnen NOsGC-Untereinheiten von der katalytischen Aktivität und damit cGMP-unabhängige Effekte vermitteln können, so dass es für die biologische Funktionalität nicht zwangsläufig zu einer Dimerisierung kommen muss. *Cai* et al. konnten zeigen, dass die Expression der α_1 -Untereinheit durch einen Androgen-abhängigen Promoter reguliert wird und dass die alleinige Überexpression der einzelnen Untereinheit ausreicht, die Proliferation von Prostatakrebszellen anzuregen. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Effekt sowohl NO-, als auch

cGMP-unabhängig ist und nicht der Gegenwart der β_1 -Untereinheit bedarf (CAI ET AL., 2007). Auch für die β_1 -Untereinheit gibt es Untersuchungen, die eine von der α_1 -Untereinheit unabhängige Funktion beschreiben. So konnten *Krumenacker et al.* zeigen, dass in nicht-differenzierten embryonalen Stammzellen nur die β_1 -Untereinheit nachweisbar ist, nicht aber die α_1 -Untereinheit (KRUMENACKER ET AL., 2006). Der β_1 -Untereinheit wird auch eine Beteiligung am Zellzyklus zugeschrieben. *Pifarré et al.* konnten zeigen, dass die β_1 -Untereinheit an Chromosomen assoziiert ist und ein Ausschalten der β_1 -Untereinheit in einem Zellkulturmodell die Proliferation begünstigt. Dagegen bremst eine Überexpression die Zellteilungsrate (PIFARRE ET AL., 2009).

Die von *Sharin et al.* (SHARIN ET AL., 2011) demonstrierte entwicklungsabhängige Expression des C- α_1 -Proteins in humanen embryonalen Stammzellen wird von den Autoren als Hinweis gedeutet, dass die α_1 -Untereinheit einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat. Dagegen spricht, dass ein Ausschalten der α_1 -Untereinheit im Tiermodell zu lebensfähigen Tieren führt (FRIEBE ET AL., 2007). Eine essentielle Funktion für die fetale und embryonale Entwicklung beim Menschen ist somit unwahrscheinlich. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die physiologische Bedeutung des C- α_1 -Proteins aufzuklären.

5.3 Weitergehende Untersuchungen zur Dimerisierung der NOsGC

Untersuchungen zur $\alpha_1\Delta N_{364}$ -Deletionsmutante

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung der um mehr als 50 % aminoterminal verkürzten $\alpha_1\Delta N_{364}$ -Untereinheit ergab, dass auch diese noch zur Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit fähig ist. Die $\alpha_1\Delta N_{364}/\beta_1$ -Isoform hat aber die Fähigkeit zur Signalweiterleitung von der regulatorischen Domäne (H-NOX) zur katalytischen Domäne eingebüßt. Das Enzym ist nicht mehr durch NO aktivierbar, obwohl der Enzymkomplex aus $\alpha_1\Delta N_{364}$ und der β_1 -Untereinheit hämhaltig ist. Durch Inkubation mit dem NO-Donor DEA/NO kommt es zu einem spektralen Wechsel. Dies bestätigt ähnliche frühere Befunde aus unserer Arbeitsgruppe (KOGLIN AND BEHRENDTS, 2003). In dieser Arbeit wird postuliert, dass der Bereich der Aminosäuren 259 bis 363 (humane Nummerierung) eine wichtige

Funktion bei der intramolekularen Signaltransduktion übernimmt. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Arbeit von *Shiga* und *Suzuki*, die zeigten, dass eine Deletion (272-313, bei humaner Nummerierung) der α_1 -Untereinheit der Fischart *Oryzias latipes* die katalytische Aktivität unter NO-stimulierten Bedingungen um das 65-fache reduziert (SHIGA AND SUZUKI, 2005).

Untersuchungen zur $\beta_1\Delta N_{H-NOX}$ -Deletionsmutante

Auch die Deletion der H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit in der vorliegenden Arbeit führt nach Koexpression mit der α_1 -Untereinheit zu einem Heterodimer. Interessanterweise war diese trunkierte Untereinheit die einzige der untersuchten Deletionsmutanten, welche im Vergleich mit dem Wildtyp eine geringere Dimerisierung zeigte. Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung der H-NOX-Domäne der β_1 -Untereinheit während der Dimerisierung sein. Durch den Verlust der β_1 -H-NOX-Domäne war das Konstrukt erwartungsgemäß hämfrei und ließ sich entsprechend auch nicht durch NO stimulieren. Zur basalen Katalyse war das Konstrukt aber durchaus in der Lage. Dies zeigt sich insbesondere bei der Bestimmung der Enzymaktivität in der Gegenwart von Mangan.

Untersuchung eines möglichen Austauschs der Enzymuntereinheiten

In der vorliegenden Arbeit ist der Versuch einen Austausch der Untereinheiten zwischen zwei Heterodimeren nachzuweisen nicht gelungen. Schon *Harteneck* et al. zeigten, dass die Aktivität der NOsGC nur nachweisbar ist, wenn die Expression der Untereinheiten in der gleichen Zelle stattfindet (HARTENECK ET AL., 1990). Aufgrund der Größe des Gesamtproteins (human: 1.309 Aminosäuren) und der innerhalb der Struktur vorhandenen Doppelwendel („coiled-coil“; MA ET AL., 2010) erscheint ein nachträglicher Austausch der Untereinheiten zweifelhaft, da die stabile Doppelwendel dazu entdrillt werden müsste. Dennoch erschien der Versuch lohnenswert, zumal es sich um einen robusten Versuchsaufbau mit vertretbarem Aufwand handelte und sich so die Möglichkeit bot einen etwaigen, doch stattfindenden posttranslationalen Austausch der Untereinheiten nachzuweisen. In der Komplexität beziehungsweise der Größe des Enzyms scheint das Unvermögen des nachträglichen Austauschs begründet zu sein, denn einzelne Domänen sind durchaus posttranslational zur Dimerisierung im Stande. Dies konnten *Winger* und *Marletta* für die katalytische

Domäne zeigen (WINGER AND MARLETTA, 2005). Damit sprechen die Ergebnisse dafür, dass Heterodimere nur cotranslational gebildet werden können.

5.4 Expression der NOsGC in prokaryotischen und zellfreien Systemen

Die Untersuchungen der Enzymaktivität der NOsGC aus *E. coli* und zwei unterschiedlichen zellfreien Systemen (prokaryotisch und eukaryotisch) sollte der Identifizierung der grundlegenden Prinzipien der Dimerisierung dienen. Es war allerdings in keinem der drei untersuchten Systeme möglich, NOsGC mit relevanter Enzymaktivität zu exprimieren. Nach Expression des α_1/β_1 -Heterodimers in *E. coli* war eine geringe Aktivität unter NO-Stimulation nachweisbar. Diese war jedoch um drei bis vier Zehnerpotenzen niedriger als bei der Expression der entsprechenden NOsGC-Isoform in Sf9-Zellen (Tabelle 8). Wurde in diesem System das Fusionskonstrukt exprimiert, so ließ sich auch die zuvor gemessene schwache Enzymaktivität des Heterodimers nicht mehr nachweisen. Durch die Expression eines Fusionskonstruktes aus der β_1 - und der α_1 -Untereinheit sollte untersucht werden, ob die niedrige Enzymaktivität in einer geringen Heterodimerisierung der α_1 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit begründet liegt. Diesem Ansatz lag die Idee zugrunde, dass die Assoziation der beiden Untereinheiten bei der Expression des Fusionskonstruktes nicht mehr posttranslational erfolgen muss. Es konnte aber keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Polypeptidkette des Fusionsproteins von über 1.300 Aminosäuren (ca. 150 kDa) für die Expression in *E. coli* zu komplex. Die erfolgreiche Expression von Proteinen in *E. coli* wird ab einer Größe von etwa 60 kDa immer unwahrscheinlicher (GRASLUND ET AL., 2008).

Diskussion

Tabelle 8

Übersicht über die spezifische Enzymaktivität der NOsGC-Isoformen aus den verschiedenen Expressionssystemen (Ø = nicht nachweisbar)

Expressionssystem	NOsGC-Isoform	Spezifische Aktivität (NO-stimuliert) [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]
Sf9-Zellen	α_1 -S/ β_1 (Koinfektion)	20
<i>E. coli</i>	α_1/β_1 -S (bicistronischer Vektor)	0,001
	$\beta_1\alpha_1$ -S (Fusionskonstrukt)	Ø
EasyXpress® (eukaryotisch / zellfrei)	α_1/β_1 -S (zwei Plasmide)	Ø
PURExpress® (prokaryotisch / zellfrei)	α_1/β_1 -S (bicistronischer Vektor)	Ø
	$\beta_1\alpha_1$ -S (Fusionskonstrukt)	Ø

In den beiden zellfreien Expressionssystemen konnte unter keiner der untersuchten Bedingungen Enzymaktivität nachgewiesen werden. Da die Enzymaktivität auch nach Expression in intakten *E. coli* Zellen sehr gering war, ist dies für das prokaryotische PURExpress® System nicht weiter überraschend. Wie im *E. coli* System führte auch die Expression des Fusionskonstrukts im PURExpress® System zu keiner katalytischen Aktivität. Dies spricht dafür, dass die fehlende Aktivität nicht auf eine mangelnde Assoziation der beiden Untereinheiten zurückzuführen ist. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in den zellfreien Systemen die Faltung der NOsGC nicht gelingt.

Die niedrige Enzymaktivität des NOsGC-Heterodimers aus *E. coli* könnte einerseits durch eine sehr kleine Fraktion richtig gefalteter NOsGC erzeugt werden. Andererseits wäre denkbar, dass die NOsGC aus *E. coli* in eine Form gefaltet wird, die eine deutlich geringere Enzymaktivität aufweist. Darauf aufbauend, sollten Bedingungen identifiziert werden, mit denen auch in den zellfreien Expressionssystemen enzymatisch aktive NOsGC gebildet werden könnte.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die NOsGC mit bekannten Chaperonen (vgl. Fußnote 48) interagiert. So konnten Interaktionen mit den Hitzeschockproteinen

HSP70 (BALASHOVA ET AL., 2005) und HSP90 (VENEMA ET AL., 2003; PAPAPETROPOULOS ET AL., 2005) gezeigt werden. HSP90 übernimmt außerdem eine essentielle Funktion bei der Dimerisierung der nNOS, einem ebenfalls an der NO/NOsGC/cGMP-Signaltransduktion beteiligten Enzym (BILLECKE ET AL., 2002). Schon in früheren Arbeiten wurde postuliert, dass Chaperone am Aufbau von Proteinkomplexen beteiligt sind und so Signaltransduktionen beeinflussen (RUTHERFORD AND ZUKER, 1994). Auf der Grundlage dieser Literatur war es naheliegend die beiden Hitzeschockproteine dem prokaryotischen zellfreien System zuzusetzen. Es konnte aber auch unter diesen Bedingungen keine Bildung katalytisch aktiver Heterodimere nachgewiesen werden.

Im Jahr 2004 erschien eine Arbeit aus dem Arbeitskreis um *Ferid Murad*, in der CCT η als Interaktionspartner der NOsGC beschrieben wurde (HANAFY ET AL., 2004). Es handelt sich dabei um die siebte Untereinheit des Chaperonins »Chaperonin containing ϵ -complex polypeptide - CCT«, welches auch als »TCP-1 Ring Complex - TRiC« bezeichnet wird. Chaperonine gehören zu einer Familie konservierter Proteine aus der Klasse der Chaperone und bilden einen Hohlraum in dessen Inneren die Faltung von bestimmten Proteine abläuft (HARTL AND HAYER-HARTL, 2009). Das CCT wird aus zwei Ringen gebildet, die aus jeweils acht verschiedenen Untereinheiten (α - θ) aufgebaut sind, so dass ein Heterohexadecamer mit einem Molekulargewicht von etwa einem MDa entsteht. Für CCT gilt, dass Proteine vermutlich maximal eine Größe von 70 kDa aufweisen dürfen, um von dem Hohlraum umschlossen werden zu können (ALTSCHULER AND WILLISON, 2008). Daraus ergibt sich, dass dieser Mechanismus für die NOsGC unwahrscheinlich ist, da beide Untereinheiten schon alleine die Größe überschreiten (α_1 : 77,4 kDa bzw. β_1 : 70,5 kDa, human). Es gibt in der Literatur Belege dafür, dass die Untereinheiten von CCT auch einzeln biologische Funktionen übernehmen können (sog. »moonlightning⁵⁰-Funktion«). So wird der CCT η -Untereinheit eine Rolle bei der Bewältigung von Stresssignalen in *Saccharomyces cerevisiae* zugesprochen (AMIT ET AL., 2010). Ebenfalls finden sich in der Literatur Belege dafür, dass CCT an der Dimerisierung von Proteinen beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass CCT für die

⁵⁰ moonlightning; ugs. für einer Nebenbeschäftigung nachgehen (HORNBY ET AL., 2010)

Dimerbildung des G $\beta\gamma$ -Komplexes der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren notwendig ist (WELLS ET AL., 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei unabhängige Methoden zum Nachweis einer möglichen Interaktion der NOsGC mit der CCT η -Untereinheit eingesetzt. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation, der Koanreinigung und der Analyse von fluoreszenzmarkiertem CCT η bestätigen die Ergebnisse von *Hanafy et al.* (HANAFY ET AL., 2004). Daher wurde die CCT η -Untereinheit bis zur Homogenität angereinigt und dem prokaryotischen zellfreien Expressionssystem zugesetzt. Das Ziel war, damit hinreichende Bedingungen für die Ausbildung katalytisch aktiver NOsGC-Heterodimere zu schaffen. Leider führte auch dieser Ansatz nicht zur Bildung katalytisch aktiver NOsGC. *Brackley* und *Grantham* warnen davor, ein Protein als Faltungssubstrat von CCT zu bezeichnen, nur weil eine Interaktion nachgewiesen wurde. Es sei nicht überraschend, dass ein auf Protein-Protein-Interaktionen spezialisiertes Protein wie CCT eine Tendenz aufweist unspezifische Bindungen mit anderen Proteinen einzugehen (BRACKLEY AND GRANTHAM, 2009).

Ein starkes Indiz für die fehlende CCT-Abhängigkeit der NOsGC bei der Faltung und / oder Dimerisierung ergibt sich durch die erfolgreiche Expression der Luciferase im EasyXpress[®] System (vgl. Abbildung 48). Die Firma *Qiagen* fügt ein Kontrollplasmid zur Expression der Luciferase aus einem Leuchtkäfer dem Reagenziensystem bei. Die Luciferase ist ein bekanntes CCT-Substrat (NIMMESGERN AND HARTL, 1993; SCHRODER ET AL., 1993; FRYDMAN ET AL., 1994; THULASIRAMAN AND MATTS, 1996), so dass das EasyXpress[®] Reagenziensystem CCT enthalten sollte. Wenn die Luciferase in diesem zellfreien System in katalytisch aktiver Form exprimiert wird, die NOsGC hingegen nicht, dann belegt dies, dass CCT zumindest nicht hinreichend für die Bildung katalytisch aktiver NOsGC ist.

Die Expression von vollständigen NOsGC-Heterodimeren mit katalytischer Aktivität ist bisher nur in eukaryotischen Zellen gelungen. Durchsucht man die in *PubMed* (vgl. Fußnote 15) indizierten Artikel nach den ersten Veröffentlichungen, die eine rekombinante NOsGC-Expression beschreiben, findet man solche ab dem Jahr 1990

(HARTENECK ET AL., 1990). Die dabei am häufigsten genutzten eukaryotischen Systeme sind die Insektenzelllinie Sf9 (z.B. GUPTA ET AL., 1997; weitere siehe Fußnote⁵¹) sowie die Wirbeltierzelllinien HEK-293 (HAASE ET AL., 2010a; HAASE ET AL., 2010c; KRAEHLING ET AL., 2011) und COS-Zellen (HARTENECK ET AL., 1990; BUECHLER ET AL., 1991; HARTENECK ET AL., 1991; XIA ET AL., 2007). Die Guanylyl-Cyclasen konnten bisher, mit einer Ausnahme (Cya2 in dem Cyanobakterium *Synechocystis PCC6803*) nur in Eukaryoten identifiziert werden (SCHAAP, 2005; RAUCH ET AL., 2008). Das überwiegende Vorkommen der Guanylyl-Cyclasen in Eukaryoten deutet auf die Notwendigkeit membranumschlossener Kompartimente hin. In einer jüngst veröffentlichten Arbeit aus unserem Arbeitskreis konnten wir zeigen, dass die aminoterminal verkürzte Spleißvariante der α_1 -Untereinheit am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (KRAEHLING ET AL., 2011). Dies könnte auf die Notwendigkeit von Organellen für den Aufbau katalytischer aktiver Heterodimere der NOsGC hindeuten. In weiteren Versuchen sollten daher Membran-Mimetika (TERRY ET AL., 2006) wie Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) eingesetzt werden. So könnte versucht werden, in den zellfreien Expressionssystemen eine Umgebung nachzubilden, wie sie im Inneren einer eukaryotischen Zelle vorherrscht. Für die erfolgreiche Expression von Membranproteinen in zellfreien Systemen wurde der Einsatz von Membran-Mimetika bereits beschrieben (Abbildung 53).

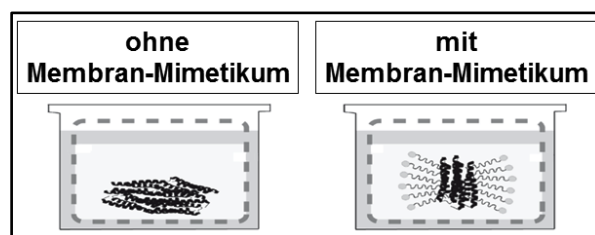


Abbildung 53

Zellfreie Expression von Proteinen in zellfreien Systemen (modifiziert nach RECKEL ET AL., 2010).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Expression in einem eukaryotischen, zellfreien System ermöglicht weitergehende Untersuchungen. Möglicherweise erlaubt dies in der Zukunft die Identifikation von Chaperon-Proteinen, Proteinkomplexen oder sogar Zellorganellen, die für die Bildung funktionell aktiver NOsGC notwendig sind.

⁵¹ ZABEL ET AL., 1998; HOENICKA ET AL., 1999; ZABEL ET AL., 1999; KOGLIN AND BEHRENDTS, 2000; LEE ET AL., 2000; BAMBERGER ET AL., 2001; KOGLIN ET AL., 2001; KOGLIN, 2002; KOGLIN AND BEHRENDTS, 2003; SHIGA AND SUZUKI, 2005; HAASE ET AL., 2010a; HAASE ET AL., 2010c; KRAEHLING ET AL., 2011

6. Zusammenfassung

Die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylyl-Cyclase ist ein wichtiges Ziel für Arzneimittel zur Behandlung von Herz-Kreislauf-erkrankungen. Das Enzym besteht aus einer α_1 - und einer β_1 -Untereinheit. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir eine neue besonders effiziente Anreinigung dieses Heterodimers etablieren. Mit Hilfe dieser neuen Methode konnten wir nachweisen, dass eine humane Spleißvariante der α_1 -Untereinheit mit der β_1 -Untereinheit ein katalytisch aktives Heterodimer bildet. Darüber hinaus zeigte sich in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, dass die aminoterminal um 258 Aminosäuren verkürzte α_1 -Variante eine spezifische Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum aufweist. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen zur subzellulären Verteilung der Spleißvariante bei Differenzierungsprozessen in embryonalen Stammzellen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden die Bedingungen der Dimerisierung und Expression der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase näher untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass eine weitergehende aminoterminal Deletion der α_1 -Untereinheit bei Koexpression mit der β_1 -Untereinheit zu einem Verlust der Aktivierbarkeit durch NO führt. Die Bindung von Häm und die Dimerisierung blieben hierbei erhalten. Dagegen führte die analoge aminoterminal Deletion der β_1 -Untereinheit nach Koexpression mit der α_1 -Untereinheit zu einem hämfreien Enzymkomplex. In zellfreien Expressionssystemen konnten wir die Untereinheiten des Enzyms erfolgreich exprimieren. Es kam allerdings nicht zur Bildung von funktionell aktiven Heterodimeren. Die Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von zellulären Bestandteilen für die Bildung eines intakten heterodimeren Enzyms hin.

7. Anhang

7.1 Sequenz der codonoptimierten Variante von β_1 -S (rat)

```
(1)  ATGTATGGTTTTGTGAATCATGCACTGGAAGTCTGGTGATTTCGTAATTA
(51) TGGTCCGGAAGTGTGGGAAGATATCAAAAAAGAAGCCCAGCTGGATCAGG
(101) AAGGTCAGTTTCTGGTTCGCATTATCTATGATCATAGCAAAACCTATGAT
(151) CTGGTTGCAGCAGCAAGCAAAGTTCTGAATCTGAATGCCGGTGAAATTCT
(201) GCAGATGTTTGGCAAAATGTTTTTTGTGTTTGGCAGGAATCTGGCTACG
(251) ATACCATTCTGCGTGTCTGGGTAGCAATGTTCTGAATTTCTGCAGAAT
(301) CTGGATGCACTGCATGATCATCTGGCAACCATTTATCCGGGTATGCGTGC
(351) ACCGAGCTTTTCGTTGTACCGATGCCGAAAAAGGTAAAGGTCTGATTCTGC
(401) ATTACTATAGCGAACGTGAAGGTCTGCAGGATATTGTGATTGGCATTATC
(451) AAAACCGTTGCCCAGCAGATTTCATGGCACCGAAATTGATATGAAAGTGAT
(501) TCAGCAGCGTAGCGAAGAATGTGATCATACCCAGTTTCTGATTGAAGAAA
(551) AAGAAAGCAAAGAAGAAGATTTTTACGAAGATCTGGATCGCTTTGAAGAA
(601) AATGGCACCCAGGATAGCCGTATTAGCCCGTATACCTTTTGTAAGCCTT
(651) TCCGTTTCATATCATTTTTGATCGCGATCTGGTTGTTACCCAGTGTGGTA
(701) ATGCCATTTATCGTGTCTGCCGCAGCTGCAGCCTGGTAAATGTAGCCTG
(751) CTGAGCGTTTTTAGCCTGGTTCGTCCGCATATTGATATTAGCTTTTCATGG
(801) CATTTCTGAGCCATATCAATACCGTTTTTGTGCTGCGTAGCAAAGAAGGTC
(851) TGCTGGACGTTGAAAACTGGAATGCGAAGATGAACTGACCGGTGCAGAA
(901) ATCAGCTGTCTGCGTCTGAAAGGTCAGATGATTTATCTGCCGGAAGCAGA
(951) TAGCATTCTGTTTCTGTGTAGCCCGAGCGTTATGAATCTGGATGATCTGA
(1001) CCCGTCGTGGTCTGTATCTGAGCGATATTCCGCTGCATGATGCAACCCGT
(1051) GATCTGGTTCTGCTGGGTGAACAGTTTCGCGAAGAATATAAACTGACCCA
(1101) GGAAGTGGAAATTTCTGACCGATCGTCTGCAGCTGACCCTGCGGGCCCTGG
(1151) AAGATGAAAAGAAAAAACCGATACCTGCTGTATAGCGTTCTGCCTCCG
(1201) AGCGTTGCAAATGAACTGCGTCATAAACGTCCGGTTCCGGCTAAACGTTA
(1251) TGATAATGTGACCATTCTGTTTAGCGGTATTGTGGGCTTTAATGCCTTTT
(1301) GTAGCAAACATGCAAGCGGTGAAGGTGCAATGAAAATTGTGAATCTGCTG
(1351) AATGATCTGTATACCCGTTTTGATACCCTGACCGATAGCCGTAAAAATCC
(1401) GTTTGTGTATAAAGTTGAAACCGTGGGCGATAAATACATGACCGTTAGCG
(1451) GTCTGCCGGAACCGTGATTTCATCATGCACGTAGCATTGTGCATCTGGCA
(1501) CTGGATATGATGGAAAATTGCAGGTCAGGTTGAGTTGATGGTGAAAGCGT
(1551) TCAGATTACCATTTGGTATTCATACCGGTGAAGTTGTTACCGGTGTTATTG
(1601) GTCAGCGTATGCCGCGTTATTGTCTGTTTGGCAATACCGTTAATCTGACC
(1651) AGCCGTACCGAAACCACCGGTGAAAAAGGCAAAATCAATGTGAGCGAATA
(1701) TACCTATCGTTGTCTGATGTCTCCGAAAAATAGCGATCCGCAGTTTCATC
(1751) TGGAACATCGTGGTCCGGTTAGCATGAAAGGTAAAAAGAACCAGTGCAG
(1801) GTTTGGTTTCTGTCTCGTAAAAATACCGGTACCGAAGAAACCAATCAGGA
(1851) TGAATAATTGGGCCCCGAGCGGTGTTGATTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAA
(1901) AA
```

7.2 Sequenzalignment zwischen den α_1 -Untereinheiten von *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*

(mit ClustalW2 erstellt)

```

α1 (human) (1) MFCTKLKDLKITGECPFSLAPGQVPNESSEEAAGSSESKATVPICQDI
α1 (rat) (1) MFCRKFKDLKITGECPFSLAPGQVPTEPIEEVAGVSESCQATLPTCQEF

α1 (human) (51) PEKNIQESLPQRKTSRSRVYLHTLAESICKLIFPEFERLNVALQRTLAKH
α1 (rat) (51) AEN-AEGSHPQRKTSRNRVYLHTLAESIGKLIFPEFERLNALQRTLAKH

α1 (human) (101) KIKESRKSLEREDFEKTIAEQAVAAGVPVEVIKESLGEEVFKICYEEDEN
α1 (rat) (100) KIKENRNSSEKEDLERIIAEEAIAAGVPVEALKDSLGEELFKICYEEDEH

α1 (human) (151) ILGVVGGTLKDFLNSFSTLLKQSSHCQEAGKRGRLEDASILCLDKEDDFL
α1 (rat) (150) ILGVVGGTLKDFLNSFSTLLKQSSHCQEAERRGRLEDASILCLDKDQDFL

α1 (human) (201) HVYFFPKRTTSLILPGIIKAAAHVLYETEVEVSLMPPCFHNDCEFEVNO
α1 (rat) (200) NVYFFPKRTTALLPGIIKAAARILYESHVEVSLMPPCFRSECTEFVNO

α1 (human) (251) PYLLYSVHMKSTKPSLSPSKPQSSSVIPTSLFCKTFPFHFMFDKDMTILQ
α1 (rat) (250) PYLLYSVHVKSTKPSLSPGKPQSSSVIPTSLFCKTFPFHFMFLDRDLAILQ

α1 (human) (301) FGNGIRRLMNRDFQGKPNFEEYFEILTPKINQTFSGIMTMLNMQFVVRV
α1 (rat) (300) LGNGIRRLVNKRDFQGKPNFEEFFEILTPKINQTFSGIMTMLNMQFVIRV

α1 (human) (351) RRWDNSVKKSSRVMDLKGQMIYIVESSAILFLGSPCVDRLDFTGRGLYL
α1 (rat) (350) RRWDNLVKKSSRVMDLKGQMIYIVESSAILFLGSPCVDRLDFTGRGLYL

α1 (human) (401) SDIPIHNALRDVVLIGEQAQDGLKKRLGKLKATLEQAHQALEEEKKKT
α1 (rat) (400) SDIPIHNALRDVVLIGEQAQDGLKKRLGKLKATLEHAHQALEEEKKKT

α1 (human) (451) VDLLCSIFPCEVAQQLWQGQVQAKKFNSVTMLFSDIVGFTAICSQCSPL
α1 (rat) (450) VDLLCSIFPSEVAQQLWQGQIVQAKKFNEVTMLFSDIVGFTAICSQCSPL

α1 (human) (501) QVITMLNALYTRFDQQCGELDVYKVETIGDAYCVAGGLHKESDTHAVQIA
α1 (rat) (500) QVITMLNALYTRFDQQCGELDVYKVETIGDAYCVAGGLHRES DTHAVQIA

α1 (human) (551) LMALKMMELSDEVMSPHGEPIKMRIGLHSGSVFAGVVGVMKMPRYCLFGNN
α1 (rat) (550) LMALKMMELSNEVMSPHGEPIKMRIGLHSGSVFAGVVGVMKMPRYCLFGNN

α1 (human) (601) VTLANKFESCSVPRKINVSPTTYRLLKDCPGFVFTPRSREELPPNFPSEI
α1 (rat) (600) VTLANKFESCSVPRKINVSPTTYRLLKDCPGFVFTPRSREELPPNFPSEI

α1 (human) (651) PGICHFLDAYQQ-GTNSKPCFQKKDVEDGNANFLGKASGID
α1 (rat) (650) PGICHFLDAYQHQPNSKPWFQKDAEDGNANFLGKASGVD

```

7.3 Übersicht über die Homologien der Aminosäuresequenzen von *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*

<i>Homo sapiens</i> versus <i>Homo sapiens</i>			
<div>human</div> <div>human</div>	α_1	α_2	β_1
α_1	100 %	49 %	29 %
α_2	49 %	100 %	32 %
β_1	29 %	32 %	100 %
<i>Rattus norvegicus</i> versus <i>Rattus norvegicus</i>			
<div>rat</div> <div>rat</div>	α_1	α_2	β_1
α_1	100 %	48 %	30 %
α_2	48 %	100 %	31 %
β_1	30 %	31 %	100 %
<i>Homo sapiens</i> versus <i>Rattus norvegicus</i>			
<div>human</div> <div>rat</div>	α_1	α_2	β_1
α_1	89 %	49 %	30 %
α_2	49 %	91 %	32 %
β_1	29 %	31 %	98 %

Werte wurden mit ClustalW2 ermittelt

8. Quellenverzeichnis

- AAIJ, C. & BORST, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 269, 192-200.
- ALTSCHULER, G. M. & WILLISON, K. R. 2008. Development of free-energy-based models for chaperonin containing TCP-1 mediated folding of actin. *J R Soc Interface*, 5, 1391-1408.
- AMIT, M., WEISBERG, S. J., NADLER-HOLLY, M., MCCORMACK, E. A., FELDMESSER, E., KAGANOVICH, D., WILLISON, K. R. & HOROVITZ, A. 2010. Equivalent Mutations in the Eight Subunits of the Chaperonin CCT Produce Dramatically Different Cellular and Gene Expression Phenotypes. *J Mol Biol*, 401, 532-543.
- ANFENSEN, C. B., REDFIELD, R. R., CHOATE, W. L., PAGE, J. & CARROLL, W. R. 1954. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem*, 207, 201-210.
- ARNAU, J., LAURITZEN, C., PETERSEN, G. E. & PEDERSEN, J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 48, 1-13.
- ARNOLD, W. P., MITTAL, C. K., KATSUKI, S. & MURAD, F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 3203-3207.
- ASCHNER, J. L. & ASCHNER, M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med*, 26, 353-362.
- ASHMAN, D. F., LIPTON, R., MELICOW, M. M. & PRICE, T. D. 1963. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun*, 11, 330-334.
- BAGDY, G., RIBA, P., KECSKEMETI, V., CHASE, D. & JUHASZ, G. 2010. Headache-type adverse effects of NO donors: vasodilation and beyond. *Br J Pharmacol*, 160, 20-35.
- BALASHOVA, N., CHANG, F.-J., LAMOTHE, M., SUN, Q. & BEUVE, A. 2005. Characterization of a Novel Type of Endogenous Activator of Soluble Guanylyl Cyclase. *J Biol Chem*, 280, 2186-2196.
- BALZAR, M. 02.02.2009. *RE: Fluorescence lifetime imaging on the A1 - Implementation, implications & applications.*
- BAMBERGER, A. M., KOGLIN, M., KEMPFERT, J., LONING, T., SCHOLZ, H. & BEHRENDTS, S. 2001. Expression and tissue localization of soluble guanylyl cyclase in the human placenta using novel antibodies directed against the alpha(2) subunit. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 909-912.
- BARRY, G. F. 1988. A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*, 71, 75-84.
- BECKER, E. M., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., GERZER, R., MINUTH, T., PLEISS, U., SCHMIDT, P., SCHRAMM, M., SCHRODER, H., SCHROEDER, W., STEINKE, W., STRAUB, A. & STASCH, J. P. 2001. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol*, 1, 1-12.
- BEHRENDTS, S., HARTENECK, C., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1995. A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem*, 270, 21109-21113.

-
- BEHRENDTS, S., KAZMIERCZAK, B., STEENPA, A., KNAUF, B., BULLERDIEK, J., SCHOLZ, H. & EIBERG, H. 1999. Assignment of GUCY1B2, the gene coding for the beta2 subunit of human guanylyl cyclase to chromosomal band 13q14.3 between markers D13S168 and D13S155. *Genomics*, 55, 126-127.
- BEHRENDTS, S. & VEHSE, K. 2000. The beta(2) subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 271, 64-69.
- BELLINGHAM, M. & EVANS, T. J. 2007. The alpha2beta1 isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. *Cell Signal*, 19, 2183-2193.
- BENZER, S. 1957. The Elementary Units of Heredity. In: MCELROY, W. D. & GLASS, B. (eds.) *A symposium on the Chemical Basis of Heredity*. Baltimore, MD, USA: Johns Hopkins Press.
- BERTANI, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 62, 293-300.
- BHAT, R., LAHAYE, T. & PANSTRUGA, R. 2006. The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods*, 2, 1-14.
- BIEL, M. & MICHALAKIS, S. 2009. Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol*. 191 ed. Heidelberg: Springer.
- BILLECKE, S. S., BENDER, A. T., KANELAKIS, K. C., MURPHY, P. J., LOWE, E. R., KAMADA, Y., PRATT, W. B. & OSAWA, Y. 2002. Hsp90 is required for heme binding and activation of apo-neuronal nitric-oxide synthase: geldanamycin-mediated oxidant generation is unrelated to any action of Hsp90. *J Biol Chem*, 277, 20504-20509.
- BIOCHEMISTRY, I. U. O., COMMITTEE, M. B. N. & WEBB, E. C. 1992. *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*, Maryland Heights, MO, USA, Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-1523.
- BJORCK, L. & KRONVALL, G. 1984. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, 133, 969-974.
- BÖHME, E., MUNSKE, K. & SCHULTZ, G. 1969. Formation of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate in various rat tissues. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 264, 220-221.
- BONKOVSKY, H. L., SIAO, P., ROIG, Z., HEDLEY-WHYTE, E. T. & FLOTTE, T. J. 2008. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 20-2008. A 57-year-old woman with abdominal pain and weakness after gastric bypass surgery. *N Engl J Med*, 358, 2813-2825.
- BRACKLEY, K. I. & GRANTHAM, J. 2009. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones*, 14, 23-31.
- BRYAN, N. S., BIAN, K. & MURAD, F. 2009. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci*, 14, 1-18.
- BUDÄUS, L. H. 2003. *Untersuchung von Untereinheiten der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase nach Kopplung mit dem grün-fluoreszierenden Protein*. Dissertation, Universität Hamburg.

Quellenverzeichnis

-
- BUDWORTH, J., MEILLERAIS, S., CHARLES, I. & POWELL, K. 1999. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun*, 263, 696-701.
- BUECHLER, W. A., NAKANE, M. & MURAD, F. 1991. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun*, 174, 351-357.
- CABILLA, J. P., DIAZ MDEL, C., MACHIAVELLI, L. I., POLIANDRI, A. H., QUINTEROS, F. A., LASAGA, M. & DUVILANSKI, B. H. 2006. 17 beta-estradiol modifies nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase expression and down-regulates its activity in rat anterior pituitary gland. *Endocrinology*, 147, 4311-4318.
- CAI, C., CHEN, S. Y., ZHENG, Z., OMWANCHA, J., LIN, M. F., BALK, S. P. & SHEMSHEDINI, L. 2007. Androgen regulation of soluble guanylyl cyclase α 1 mediates prostate cancer cell proliferation. *Oncogene*, 26, 1606-1615.
- CARBONELL, L. F., KLOWDEN, M. J. & MILLER, L. K. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J Virol*, 56, 153-160.
- CARDULLO, R. A. 2007. Theoretical Principles and Practical Considerations for Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. In: GREENFIELD, S. & DAVID, E. W. (eds.) *Methods in Cell Biology*. Maryland Heights, MO, USA: Academic Press.
- CARNINCI, P. 2009. Is sequencing enlightenment ending the dark age of the transcriptome? *Nat Methods*, 6, 711-713.
- ČERENKOV, P. A. 1934. Visible emission of clean liquids by action of γ radiation. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 451, 149-153.
- CHAN, P. S. & LIN, M. C. 1974. Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation. *Methods Enzymol*, 38, 38-41.
- CHEN, Z., ZHANG, J. & STAMLER, J. S. 2002. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8306-8311.
- CHHAJLANI, V., FRÄNDBERG, P.-A., AHLNER, J., AXELSSON, K. L. & WIKBERG, J. E. S. 1991. Heterogeneity in human soluble guanylate cyclase due to alternative splicing. *FEBS Letters*, 290, 157-158.
- CHI, E. Y., KRISHNAN, S., RANDOLPH, T. W. & CARPENTER, J. F. 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res*, 20, 1325-1336.
- CHIRKOV, Y. Y. & HOROWITZ, J. D. 2007. Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol Ther*, 116, 287-305.
- CLARK, R. H., KUESER, T. J., WALKER, M. W., SOUTHGATE, W. M., HUCKABY, J. L., PEREZ, J. A., ROY, B. J., KESZLER, M. & KINSELLA, J. P. 2000. Low-Dose Nitric Oxide Therapy for Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *N Engl J Med*, 342, 469-474.
- COSSINS, A. & BERENBRINK, M. 2008. Physiology: Myoglobin's new clothes. *Nature*, 454, 416-417.
- CRAVEN, P. A. & DERUBERTIS, F. R. 1978. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem*, 253, 8433-8443.
- CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J.-M. & BRENNER, S. E. 2004. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res*, 14, 1188-1190.

-
- DENNINGER, J. W., SCHELVIS, J. P., BRANDISH, P. E., ZHAO, Y., BABCOCK, G. T. & MARLETTA, M. A. 2000. Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry*, 39, 4191-4198.
- DERBYSHIRE, E. R. & MARLETTA, M. A. 2009. Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb Exp Pharmacol*. 191 ed. Heidelberg: Springer.
- DOUGHERTY, R. M. 1964. Animal virus titration techniques. *Techniques in Experimental Virology*. Maryland Heights, MO, USA: Academic Press.
- EDLER, R. 2004. Cherenkov Messung von 32P – Geräte Performance. *Handbuch des Herstellers PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA)*.
- ELBING, K. & BRENT, R. 2002. Growth in liquid media. *Curr Protoc Mol Biol*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- EMMONS, T. L., MATHIS, K. J., SHUCK, M. E., REITZ, B. A., CURRAN, D. F., WALKER, M. C., LEONE, J. W., DAY, J. E., BIENKOWSKI, M. J., FISCHER, H. D. & TOMASSELLI, A. G. 2009. Purification and characterization of recombinant human soluble guanylate cyclase produced from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*, 65, 133-139.
- ESSER, M. 24.01.2011. RE: E-Mail-Korrespondenz mit dem technischen Support von New England Biolabs.
- EVGENOV, O. V., PACHER, P., SCHMIDT, P. M., HASKO, G., SCHMIDT, H. H. & STASCH, J. P. 2006. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 755-768.
- FAZEKAS DE ST GROTH, S., WEBSTER, R. G. & DATYNER, A. 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta*, 71, 377-391.
- FOERSTER, J., HARTENECK, C., MALKEWITZ, J., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1996. A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur J Biochem*, 240, 380-386.
- FÖRSTER, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Physik*, 6(2), 55-75.
- FÖRSTERMANN, U. 2006. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem*, 387, 1521-1533.
- FRANCIS, S. H., CORBIN, J. D. & BISCHOFF, E. 2009. Cyclic GMP-hydrolyzing phosphodiesterases. *Handb Exp Pharmacol*. 191 ed. Heidelberg: Springer.
- FREY, R., MUCK, W., UNGER, S., ARTMEIER-BRANDT, U., WEIMANN, G. & WENSING, G. 2008. Single-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 63-2521: an ascending-dose study in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*, 48, 926-934.
- FRIEBE, A., MERGIA, E., DANGEL, O., LANGE, A. & KOESLING, D. 2007. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7699-7704.
- FRIEBE, A., MULLERSHAUSEN, F., SMOLENSKI, A., WALTER, U., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1998. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol*, 54, 962-967.

Quellenverzeichnis

-
- FRITZ, B. G., HU, X., BRAILEY, J. L., BERRY, R. E., WALKER, F. A. & MONTFORT, W. R. 2011. Oxidation and Loss of Heme in Soluble Guanylyl Cyclase from *Manduca sexta*. *Biochemistry*, 50, 5813–5815.
- FRYDMAN, J., NIMMESGERN, E., OHTSUKA, K. & HARTL, F. U. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, 370, 111–117.
- FURCHGOTT, R. F. 1996. The Discovery of Endothelium-Derived Relaxing Factor and Its Importance in the Identification of Nitric Oxide. *JAMA*, 276, 1186–1188.
- GAO, Y. 2010. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch*, 459, 829–839.
- GARBERS, D. L. 1991. The guanylyl cyclase-receptor family. *Can J Physiol Pharmacol*, 69, 1618–1621.
- GARTHWAITE, J. 2010. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem*, 334, 221–232.
- GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C. L., NIELSEN, E. B., SCHMIDT, K. & MAYER, B. 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*, 48, 184–188.
- GIULI, G., SCHOLL, U., BULLE, F. & GUELLAEN, G. 1992. Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett*, 304, 83–88.
- GLADWIN, M. T. 2006. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest*, 116, 2330–2332.
- GOSSAUER, A. 2006. *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: eine Einführung in die organische Chemie*, Weinheim, Wiley-VCH.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59–74.
- GRASLUND, S., NORDLUND, P., WEIGELT, J., HALLBERG, B. M., BRAY, J., GILEADI, O., KNAPP, S., OPPERMAN, U., ARROWSMITH, C., HUI, R., MING, J., DHE-PAGANON, S., PARK, H. W., SAVCHENKO, A., YEE, A., EDWARDS, A., VINCENTELLI, R., CAMBILLAU, C., KIM, R., KIM, S. H., RAO, Z., SHI, Y., TERWILLIGER, T. C., KIM, C. Y., HUNG, L. W., WALDO, G. S., PELEG, Y., ALBECK, S., UNGER, T., DYM, O., PRILUSKY, J., SUSSMAN, J. L., STEVENS, R. C., LESLEY, S. A., WILSON, I. A., JOACHIMIAK, A., COLLART, F., DEMENTIEVA, I., DONNELLY, M. I., ESCHENFELDT, W. H., KIM, Y., STOLS, L., WU, R., ZHOU, M., BURLEY, S. K., EMTAGE, J. S., SAUDER, J. M., THOMPSON, D., BAIN, K., LUZ, J., GHEYI, T., ZHANG, F., ATWELL, S., ALMO, S. C., BONANNO, J. B., FISER, A., SWAMINATHAN, S., STUDIER, F. W., CHANCE, M. R., SALI, A., ACTON, T. B., XIAO, R., ZHAO, L., MA, L. C., HUNT, J. F., TONG, L., CUNNINGHAM, K., INOUE, M., ANDERSON, S., JANJUA, H., SHASTRY, R., HO, C. K., WANG, D., WANG, H., JIANG, M., MONTELIONE, G. T., STUART, D. I., OWENS, R. J., DAENKE, S., SCHUTZ, A., HEINEMANN, U., YOKOYAMA, S., BUSSOW, K. & GUNSALUS, K. C. 2008. Protein production and purification. *Nat Methods*, 5, 135–146.
- GRAY, J. M., KAROW, D. S., LU, H., CHANG, A. J., CHANG, J. S., ELLIS, R. E., MARLETTA, M. A. & BARGMANN, C. I. 2004. Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature*, 430, 317–322.
- GRUBINA, R., HUANG, Z., SHIVA, S., JOSHI, M. S., AZAROV, I., BASU, S., RINGWOOD, L. A., JIANG, A., HOGG, N., KIM-SHAPIRO, D. B. & GLADWIN, M. T. 2007. Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin. *J Biol Chem*, 282, 12916–12927.

-
- GUEx, N. & PEITSCH, M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714-2723.
- GUPTA, G., KIM, J., YANG, L., STURLEY, S. L. & DANZIGER, R. S. 1997. Expression and purification of soluble, active heterodimeric guanylyl cyclase from baculovirus. *Protein Expr Purif*, 10, 325-330.
- GUTSCHER, M., PAULEAU, A. L., MARTY, L., BRACH, T., WABNITZ, G. H., SAMSTAG, Y., MEYER, A. J. & DICK, T. P. 2008. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*, 5, 553-559.
- HAASE, N., HAASE, T., KRAEHLING, J. R. & BEHREND, S. 2010a. Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive guanylyl cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol*, 80, 1676-1683.
- HAASE, N., HAASE, T., SEEANNER, M. & BEHREND, S. 2010b. Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. *J Neurochem*, 112, 542-551.
- HAASE, T. 2006. *Functional domains involved in soluble guanylyl cyclase heterodimerization*. Master-Thesis, University of Toronto.
- HAASE, T., HAASE, N., KRAEHLING, J. R. & BEHREND, S. 2010c. Fluorescent fusion proteins of soluble guanylyl cyclase indicate proximity of the heme nitric oxide domain and catalytic domain. *PLoS One*, 5, e11617.
- HAGHIKIA, A., MERGIA, E., FRIEBE, A., EYSEL, U. T., KOESLING, D. & MITTMANN, T. 2007. Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci*, 27, 818-823.
- HALL, C. N. & GARTHWAITE, J. 2009. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide*, 21, 92-103.
- HAMZA, I. 2006. Intracellular trafficking of porphyrins. *ACS Chem Biol*, 1, 627-629.
- HANAFY, K. A., MARTIN, E. & MURAD, F. 2004. CCTeta, a novel soluble guanylyl cyclase-interacting protein. *J Biol Chem*, 279, 46946-46953.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- HANKS, J. H. & WALLACE, R. E. 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc Soc Exp Biol Med*, 71, 196-200.
- HANSELLE, G. 29.08.2011. RE: E-Mail-Korrespondenz beim technischen Support von Qiagen.
- HANSON, G. T., AGGELER, R., OGLESBEE, D., CANNON, M., CAPALDI, R. A., TSIEN, R. Y. & REMINGTON, S. J. 2004. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *J Biol Chem*, 279, 13044-13053.
- HARDMAN, J. G. & SUTHERLAND, E. W. 1969. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem*, 244, 6363-6370.
- HARRIS, R. & POLAYES, D. A. 1997. A New Baculovirus Expression Vector For The Simultaneous Expression Of Two Heterologous Proteins In The Same Insect Cell. *Focus*, 19, 10-12.

Quellenverzeichnis

-
- HARTENECK, C., KOESLING, D., SOLING, A., SCHULTZ, G. & BOHME, E. 1990. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett*, 272, 221-223.
- HARTENECK, C., WEDEL, B., KOESLING, D., MALKEWITZ, J., BOHME, E. & SCHULTZ, G. 1991. Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett*, 292, 217-222.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 574-581.
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. 1985. Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 326, 91-101.
- HOENICKA, M., BECKER, E.-M., APELER, H., SIRICHOKE, T., SCHRÖDER, H., GERZER, R. & STASCH, J.-P. 1999. Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med*, 77, 14-23.
- HOFFMANN, L. S., SCHMIDT, P. M., KEIM, Y., SCHAEFER, S., SCHMIDT, H. H. & STASCH, J. P. 2009. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*, 157, 781-795.
- HOFFMÜLLER, U., RUSSWURM, M., KLEINJUNG, F., ASHURST, J., OSCHKINAT, H., VOLKMER-ENGERT, R., KOESLING, D. & SCHNEIDER-MERGENER, J. 1999. Interaction of a PDZ Protein Domain with a Synthetic Library of All Human Protein C Termini. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38, 2000-2004.
- HOFMANN, F., BERNHARD, D., LUKOWSKI, R. & WEINMEISTER, P. 2009. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol*. 191 ed. Heidelberg: Springer.
- HOGAN, C., SERPENTE, N., COGRAM, P., HOSKING, C. R., BIALUCHA, C. U., FELLER, S. M., BRAGA, V. M., BIRCHMEIER, W. & FUJITA, Y. 2004. Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol*, 24, 6690-6700.
- HOHFELD, J. & HARTL, F. U. 1994. Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J Cell Biol*, 126, 305-315.
- HOPKINS, R. & ESPOSITO, D. 2009. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *BioTechniques*, 47, 785-788.
- HORNBY, A., TURNBULL, J., LEA, D., PARKINSON, D. & PHILLIPS, P. 2010. *Oxford Advanced Learner's Dictionary*, Oxford, UK, Oxford University Press.
- HUGHES, P. R. & WOOD, H. A. 1986. In vivo and in vitro bioassay methods of baculoviruses. *The Biology of Baculovirus*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- IBA 2010. Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag. *Handbuch des Herstellers Iba-Go (Göttingen)*.
- IBRAHIM, M., DERBYSHIRE, E. R., MARLETTA, M. A. & SPIRO, T. G. 2010. Probing soluble guanylate cyclase activation by CO and YC-1 using resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*, 49, 3815-3823.
- IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. & CHAUDHURI, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9265-9269.

-
- IGNARRO, L. J., BYRNS, R. E., TRINH, K., SISODIA, M. & BUGA, G. M. 2002. Nebivolol: a selective [beta]1-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide*, 7, 75-82.
- IGNARRO, L. J., WOOD, K. S. & WOLIN, M. S. 1982. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2870-2873.
- INVITROGEN 2008. Bac-to-Bac® TOPO® Expression System. *Handbuch des Herstellers Invitrogen (Darmstadt)*.
- IUPAC-IUB 1984. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J*, 219, 345-373.
- JAKOBS, K. H., BÖHME, L. & SCHULTZ, G. 1976. Determination of Cyclic GMP in Biological Material. In: DUMONT, J. E., BROWN, B. L. & MARSHALL, N. J. (eds.) *Eukaryotic cell function and growth: regulation by intracellular cyclic nucleotides*. New York, NY, USA: Plenum Press.
- KAJIMURA, M., FUKUDA, R., BATEMAN, R. M., YAMAMOTO, T. & SUEMATSU, M. 2010. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxid Redox Signal*, 13, 157-192.
- KAMISAKI, Y., SAHEKI, S., NAKANE, M., PALMIERI, J. A., KUNO, T., CHANG, B. Y., WALDMAN, S. A. & MURAD, F. 1986. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*, 261, 7236-7241.
- KANAI, A. J., PEARCE, L. L., CLEMENS, P. R., BIRDER, L. A., VANBIBBER, M. M., CHOI, S.-Y., DE GROAT, W. C. & PETERSON, J. 2001. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14126-14131.
- KANG, D., GHO, Y. S., SUH, M. & KANG, C. 2002. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*, 23, 1511-1512.
- KAROW, D. S., PAN, D., TRAN, R., PELLICENA, P., PRESLEY, A., MATHIES, R. A. & MARLETTA, M. A. 2004. Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Biochemistry*, 43, 10203-10211.
- KATSUKI, S., ARNOLD, W., MITTAL, C. & MURAD, F. 1977. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, 3, 23-35.
- KELLOGG, T. F. 1983. The effect of sample composition and vial type on Cerenkov counting in a liquid scintillation counter. *Anal Biochem*, 134, 137-143.
- KENNEDY, M. B. 1995. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci*, 20, 102-103.
- KIMURA, H. & MURAD, F. 1974a. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem*, 249, 6910-6916.
- KIMURA, H. & MURAD, F. 1974b. Nonenzymatic formation of guanosine 3':5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem*, 249, 329-331.
- KIMURA, H. & MURAD, F. 1975. Localization of particulate guanylate cyclase in plasma membranes and microsomes of rat liver. *J Biol Chem*, 250, 4810-4817.
- KO, F., WU, C., KUO, S., LEE, F. & TENG, C. 1994. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*, 84, 4226-4233.

Quellenverzeichnis

-
- KOGLIN, M. 2002. *Untersuchungen zu Isoformen der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase beim Menschen und bei der Ratte (Rattus norvegicus, Berk.)*. Dissertation, Universität Hamburg.
- KOGLIN, M. & BEHRENDTS, S. 2000. Cloning and functional expression of the rat alpha(2) subunit of soluble guanylyl cyclase. *Biochim Biophys Acta*, 1494, 286-289.
- KOGLIN, M. & BEHRENDTS, S. 2003. A functional domain of the alpha1 subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *J Biol Chem*, 278, 12590-12597.
- KOGLIN, M., VEHSE, K., BUDAEUS, L., SCHOLZ, H. & BEHRENDTS, S. 2001. Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J Biol Chem*, 276, 30737-30743.
- KOSARIKOV, D. N., LEE, J. M., UVERSKY, V. N. & COUNTS GERBER, N. 2001. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. *J Inorg Biochem*, 87, 267-276.
- KOZAK, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 15, 8125-8148.
- KRAEHLING, J. R., BUSKER, M., HAASE, N., HAASE, T., LINNENBAUM, M., OBERLE, S. & BEHRENDTS, S. Year. Analysis of Requirements for Dimerization of Nitric Oxide Sensitive Guanylyl Cyclase. In: Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft [DPhG], 2010 Braunschweig.
- KRAEHLING, J. R., BUSKER, M., HAASE, T., HAASE, N., KOGLIN, M., LINNENBAUM, M. & BEHRENDTS, S. 2011. The amino-terminus of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase alpha does not affect dimerization but influences subcellular localization. *PLoS One*, 6, e25772.
- KRUMENACKER, J. S., KATSUKI, S., KOTS, A. & MURAD, F. 2006. Differential expression of genes involved in cGMP-dependent nitric oxide signaling in murine embryonic stem (ES) cells and ES cell-derived cardiomyocytes. *Nitric Oxide*, 14, 1-11.
- LAFFLY, E., MACDONALD, J. & GARCIN, E. 2009. From biochemical and structural studies of soluble guanylate cyclase toward drug design. *BMC Pharmacology*, 9, 39.
- LANDFRIED, D. A., VULETICH, D. A., POND, M. P. & LECOMTE, J. T. 2007. Structural and thermodynamic consequences of b heme binding for monomeric apoglobins and other apoproteins. *Gene*, 398, 12-28.
- LAUDER BRUNTON, T. 1867. ON THE USE OF NITRITE OF AMYL IN ANGINA PECTORIS. *Lancet*, 90, 97-98.
- LEE, Y. C., MARTIN, E. & MURAD, F. 2000. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10763-10768.
- LEIPER, J. & NANDI, M. 2011. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 277-291.
- LEISTNER, E. & BRECKLE, S. W. 2000. *Pharmazeutische Biologie: Grundlagen und Systematik*, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft.
- LI, H. & FÖRSTERMANN, U. 2010. Pharmakologie von NO und der Nitrate. Ein Autoabgas macht Karriere. *Pharm Unserer Zeit*, 39, 345-350.
- LICHTY, J. J., MALECKI, J. L., AGNEW, H. D., MICHELSON-HOROWITZ, D. J. & TAN, S. 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif*, 41, 98-105.

-
- LIST, B. M., KLOSCH, B., VOLKER, C., GORREN, A. C., SESSA, W. C., WERNER, E. R., KUKOVETZ, W. R., SCHMIDT, K. & MAYER, B. 1997. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*, 323, 159-165.
- LIU, Y., RUOHO, A. E., RAO, V. D. & HURLEY, J. H. 1997. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13414-13419.
- LOTTSPEICH, F. & ENGELS, J. W. 2006. *Bioanalytik*, München, Elsevier.
- LUCAS, K. A., PITARI, G. M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K. P. & WALDMAN, S. A. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 52, 375-414.
- LUCKOW, V. A., LEE, S. C., BARRY, G. F. & OLINS, P. O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 67, 4566-4579.
- LUGINBILL, P. 1928. *The fall army worm*, Washington, D.C., USA, U.S. Dept. of Agriculture.
- LUNDBERG, J. O., GLADWIN, M. T., AHLUWALIA, A., BENJAMIN, N., BRYAN, N. S., BUTLER, A., CABRALES, P., FAGO, A., FEELISCH, M., FORD, P. C., FREEMAN, B. A., FRENNEAUX, M., FRIEDMAN, J., KELM, M., KEVIL, C. G., KIM-SHAPIRO, D. B., KOZLOV, A. V., LANCASTER, J. R., JR., LEFER, D. J., MCCOLL, K., MCCURRY, K., PATEL, R. P., PETERSSON, J., RASSAF, T., REUTOV, V. P., RICHTER-ADDO, G. B., SCHECHTER, A., SHIVA, S., TSUCHIYA, K., VAN FAASSEN, E. E., WEBB, A. J., ZUCKERBRAUN, B. S., ZWEIER, J. L. & WEITZBERG, E. 2009. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol*, 5, 865-869.
- LUNDBERG, J. O., WEITZBERG, E. & GLADWIN, M. T. 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 156-167.
- MA, X., BEUVE, A. & VAN DEN AKKER, F. 2010. Crystal structure of the signaling helix coiled-coil domain of the beta1 subunit of the soluble guanylyl cyclase. *BMC Struct Biol*, 10, 2.
- MA, X., SAYED, N., BASKARAN, P., BEUVE, A. & VAN DEN AKKER, F. 2008. PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J Biol Chem*, 283, 1167-1178.
- MACKENZIE, I. S., MAKI-PETAJA, K. M., MCENIERY, C. M., BAO, Y. P., WALLACE, S. M., CHERIYAN, J., MONTEITH, S., BROWN, M. J. & WILKINSON, I. B. 2005. Aldehyde dehydrogenase 2 plays a role in the bioactivation of nitroglycerin in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1891-1895.
- MAFFEI, A., DI PARDO, A., CARANGI, R., CARULLO, P., POULET, R., GENTILE, M. T., VECCHIONE, C. & LEMBO, G. 2007. Nebivolol Induces Nitric Oxide Release in the Heart Through Inducible Nitric Oxide Synthase Activation. *Hypertension*, 50, 652-656.
- MAINES, M. D. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*, 2, 2557-2568.
- MARIANAYAGAM, N. J., SUNDE, M. & MATTHEWS, J. M. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci*, 29, 618-625.
- MARTIN, E., BERKA, V., TSAI, A. L. & MURAD, F. 2005. Soluble guanylyl cyclase: the nitric oxide receptor. *Methods Enzymol*, 396, 478-492.
- MARTIN, F., BASKARAN, P., MA, X., DUNTEN, P. W., SCHAEFER, M., STASCH, J. P., BEUVE, A. & VAN DEN AKKER, F. 2010. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to *Nostoc* H-NOX

Quellenverzeichnis

-
- domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem*, 285, 22651-22657.
- MARTIN, K., KOPPERUD, K., CHAKRABARTY, R., BANERJEE, R., BROOKS, R. & GOODIN, M. M. 2009. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *Plant J*, 59, 150-162.
- MCKINSEY, T. A. & KASS, D. A. 2007. Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 617-635.
- MERCIER, J. C., HUMMLER, H., DURRMEYER, X., SANCHEZ-LUNA, M., CARNIELLI, V., FIELD, D., GREENOUGH, A., VAN OVERMEIRE, B., JONSSON, B., HALLMAN, M. & BALDASSARRE, J. 2010. Inhaled nitric oxide for prevention of bronchopulmonary dysplasia in premature babies (EUNO): a randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 346-354.
- MERGIA, E., FRIEBE, A., DANGEL, O., RUSSWURM, M. & KOESLING, D. 2006. Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest*, 116, 1731-1737.
- MERGIA, E., RUSSWURM, M., ZOIDL, G. & KOESLING, D. 2003. Major occurrence of the new $\alpha 2\beta 1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal*, 15, 189-195.
- MEURER, S., PIOCH, S., PABST, T., OPITZ, N., SCHMIDT, P. M., BECKHAUS, T., WAGNER, K., MATT, S., GEGENBAUER, K., GESCHKA, S., KARAS, M., STASCH, J. P., SCHMIDT, H. H. & MÜLLER-ESTERL, W. 2009. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. *Circ Res*, 105, 33-41.
- MEYER, A. J. & DICK, T. P. 2010. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal*, 13, 621-650.
- MIKI, N., KAWABE, Y. & KURIYAMA, K. 1977. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 75, 851-856.
- MILLER, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- MILLER, M. R. & MEGSON, I. L. 2007. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol*, 151, 305-321.
- MÖGLICH, A., AYERS, R. A. & MOFFAT, K. 2009. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure*, 17, 1282-1294.
- MORTON, D. B. 2004. Atypical soluble guanylyl cyclases in *Drosophila* can function as molecular oxygen sensors. *J Biol Chem*, 279, 50651-50653.
- MÜLLER-ESTERL, W. & PLENIKOWSKI, M. 2009. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, München, Spektrum Akademischer Verlag.
- MURRELL, W. 1879. Nitroglycerin as a remedy for angina pectoris. *Lancet*, 113, 80-81.
- MUSTAFA, A. K., GADALLA, M. M. & SNYDER, S. H. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal*, 2, re2.
- NADERSHAHI, A., FAHRENKRUG, S. C. & ELLIS, L. B. 2004. Comparison of computational methods for identifying translation initiation sites in EST data. *BMC Bioinformatics*, 5, 14.
- NEDVETSKY, P. I., MEURER, S., OPITZ, N., NEDVETSKAYA, T. Y., MÜLLER, H. & SCHMIDT, H. H. 2008. Heat shock protein 90 regulates stabilization rather than activation of soluble guanylate cyclase. *FEBS Letters*, 582, 327-331.

-
- NIMMESGERN, E. & HARTL, F. U. 1993. ATP-dependent protein refolding activity in reticulocyte lysate. Evidence for the participation of different chaperone components. *FEBS Lett*, 331, 25-30.
- NOURRY, C., GRANT, S. G. N. & BORG, J.-P. 2003. PDZ Domain Proteins: Plug and Play! *Sci STKE*, 2003, re7.
- NOVAGEN 2010. pET System Manual. *Handbuch des Herstellers Novagen (Darmstadt)*.
- OHLSTEIN, E. H., WOOD, K. S. & IGNARRO, L. J. 1982. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys*, 218, 187-198.
- OMORI, K. & KOTERA, J. 2007. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res*, 100, 309-327.
- PALMER, R. M., FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.
- PALMER, R. M. & MONCADA, S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 158, 348-352.
- PAPAPETROPOULOS, A., ZHOU, Z., GERASSIMOU, C., YETIK, G., VENEMA, R. C., ROUSSOS, C., SESSA, W. C. & CATRAVAS, J. D. 2005. Interaction between the 90-kDa Heat Shock Protein and Soluble Guanylyl Cyclase: Physiological Significance and Mapping of the Domains Mediating Binding. *Mol Pharmacol*, 68, 1133-1141.
- PEARLMAN, J. T. & ADAMS, G. L. 1970. Amyl Nitrite Inhalation Fad. *JAMA*, 212, 160.
- PEARSON, E. S., GOSSET, W. S., PLACKETT, R. L. & BARNARD, G. A. 1990. *Student: a statistical biography of William Sealy Gosset*, Gloucestershire, UK, Clarendon Press.
- PEDERSEN, A. G. & NIELSEN, H. 1997. Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 5, 226-233.
- PIFARRE, P., BALTRONS, M. A., FOLDI, I. & GARCIA, A. 2009. NO-sensitive guanylyl cyclase beta1 subunit is peripherally associated to chromosomes during mitosis. Novel role in chromatin condensation and cell cycle progression. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 1719-1730.
- POLIDORI, M. 16.02.2011. RE: E-Mail Korrespondenz mit dem technischen Support von Invitrogen.
- POLISKY, B., GREENE, P., GARFIN, D. E., MCCARTHY, B. J., GOODMAN, H. M. & BOYER, H. W. 1975. Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3310-3314.
- PSCHYREMBEL, W. & GRUYTER, W. D. 2007. *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch*, Berlin, Walter De Gruyter Inc.
- RALL, T. W. & SUTHERLAND, E. W. 1958. FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES. *J Biol Chem*, 232, 1065-1076.
- RASSAF, T., FLOGEL, U., DREXHAGE, C., HENDGEN-COTTA, U., KELM, M. & SCHRADER, J. 2007. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res*, 100, 1749-1754.
- RAUCH, A., LEIPELT, M., RUSSWURM, M. & STEEGBORN, C. 2008. Crystal structure of the guanylyl cyclase Cya2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15720-15725.

Quellenverzeichnis

-
- RECKEL, S., SOBHANIFAR, S., DURST, F., LOHR, F., SHIROKOV, V. A., DOTSCHE, V. & BERNHARD, F. 2010. Strategies for the cell-free expression of membrane proteins. *Methods Mol Biol*, 607, 187-212.
- REED, L. & MUENCH, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoint. *Am J Hyg*, 493-497.
- REHM, H. & LETZEL, T. 2009. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Heidelberg, Spektrum-Akademischer Verlag.
- REMANE, H. & REMANE, Y. 2010. Entdeckungsgeschichte des Nitroglycerins. Ein Sprengstoff wird Medikament. *Pharm Unserer Zeit*, 39, 340-344.
- REYNOLDS, M. F. & BURSTYN, J. N. 2000. Mechanism of Activation of Soluble Guanylyl Cyclase by NO. In: IGNARRO, L. J. (ed.) *Nitric oxide : biology and pathobiology*. 1st ed. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- RICE, P., LONGDEN, I. & BLEASBY, A. 2000. EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*, 16, 276-277.
- RITTER, D., TAYLOR, J. F., HOFFMANN, J. W., CARNAGHI, L., GIDDINGS, S. J., ZAKERI, H. & KWOK, P. Y. 2000. Alternative splicing for the alpha1 subunit of soluble guanylate cyclase. *Biochem J*, 346, 811-816.
- ROBINSON, C. R., LIU, Y., THOMSON, J. A., STURTEVANT, J. M. & SLIGAR, S. G. 1997. Energetics of heme binding to native and denatured states of cytochrome b562. *Biochemistry*, 36, 16141-16146.
- ROSPERT, S., LOOSER, R., DUBAQUIE, Y., MATOUSCHEK, A., GLICK, B. S. & SCHATZ, G. 1996. Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J*, 15, 764-774.
- ROTHKEGEL, C., SCHMIDT, P. M., ATKINS, D. J., HOFFMANN, L. S., SCHMIDT, H. H., SCHRODER, H. & STASCH, J. P. 2007. Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. *Mol Pharmacol*, 72, 1181-1190.
- RUSSWURM, M., BEHREND, S., HARTENECK, C. & KOESLING, D. 1998. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J*, 335 (Pt 1), 125-130.
- RUSSWURM, M., WITTAU, N. & KOESLING, D. 2001. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, 276, 44647-44652.
- RUTH, P. 1999. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther*, 82, 355-372.
- RUTHERFORD, S. L. & ZUKER, C. S. 1994. Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell*, 79, 1129-1232.
- SAMBROOK, R. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SASSE, A. 13.08.2009. RE: E-Mail-Korrespondenz mit dem technischen Support von New England Biolabs.
- SAYED, N., BASKARAN, P., MA, X., VAN DEN AKKER, F. & BEUVE, A. 2007. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12312-12317.

-
- SCHAAP, P. 2005. Guanylyl cyclases across the tree of life. *Front Biosci*, 10, 1485-98.
- SCHERMULY, R. T., STASCH, J. P., PULLAMSETTI, S. S., MIDDENDORFF, R., MULLER, D., SCHLUTER, K. D., DINGENDORF, A., HACKEMACK, S., KOLOSIONEK, E., KAULEN, C., DUMITRASCU, R., WEISSMANN, N., MITTENDORF, J., KLEPETKO, W., SEEGER, W., GHOFrani, H. A. & GRIMMINGER, F. 2008. Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 32, 881-891.
- SCHMIDT, H. H., SCHMIDT, P. M. & STASCH, J. P. 2009. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol*. 191 ed. Heidelberg: Springer.
- SCHMIDT, P. M., ROTHKEGEL, C., WUNDER, F., SCHRODER, H. & STASCH, J. P. 2005. Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 513, 67-74.
- SCHMIDT, P. M., SCHRAMM, M., SCHRODER, H., WUNDER, F. & STASCH, J. P. 2004. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem*, 279, 3025-3032.
- SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255, 753-766.
- SCHMIDT, T. G. & SKERRA, A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, 2, 1528-1535.
- SCHNEIDER, T. D. & STEPHENS, R. M. 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res*, 18, 6097-6100.
- SCHRAMMEL, A., BEHREND, S., SCHMIDT, K., KOESLING, D. & MAYER, B. 1996. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, 50, 1-5.
- SCHRODER, H., LANGER, T., HARTL, F. U. & BUKAU, B. 1993. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J*, 12, 4137-3144.
- SCHULTZ, G. & BÖHME, E. 1984. GTP pyrophosphate-lyase (cyclizing), EC 4.6.1.2. In: BERGMAYER, H. U., BERGMAYER, J. & GRASSEL, M. (eds.) *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie.
- SCHULTZ, G., BOHME, E. & MUNSKE, K. 1969. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci*, 8, 1323-1332.
- SCHULTZ, I. J., CHEN, C., PAW, B. H. & HAMZA, I. 2010. Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. *J Biol Chem*, 285, 26753-26759.
- SCHULTZ, K. & SCHULTZ, G. 1977. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature*, 265, 750-751.
- SCHWABE, U. & PAFFRATH, D. 2006. *Arzneiverordnungs-Report 2005: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*, Heidelberg, Springer.
- SEEANNER, M., KRAEHLING, J. R., BUSKER, M. & BEHREND, S. Year. Distinct NADPH-cytochrome P450 reductase dependence of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2. In: World Pharma 2010, 2010 Copenhagen, DK.
- SHARIN, V. G., MUJOO, K., KOTS, A. Y., MARTIN, E., MURAD, F. & SHARINA, I. G. 2011. Nitric oxide receptor soluble guanylyl cyclase undergoes splicing regulation in differentiating human embryonic cells. *Stem Cells Dev*, 20, 1287-1293.

Quellenverzeichnis

-
- SHARINA, I. G., COTE, G. J., MARTIN, E., DOURSOUT, M. F. & MURAD, F. 2011. RNA splicing in regulation of nitric oxide receptor soluble guanylyl cyclase. *Nitric Oxide*, 25, 265-274.
- SHARINA, I. G., JELEN, F., BOGATENKOVA, E. P., THOMAS, A., MARTIN, E. & MURAD, F. 2008. Alpha1 soluble guanylyl cyclase (sGC) splice forms as potential regulators of human sGC activity. *J Biol Chem*, 283, 15104-15113.
- SHAW, G. A *HEK293 Cell Database* [Online]. Available: <http://www.mbi.ufl.edu/~shaw/293.html> [Accessed 29.03.2011].
- SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M. & GRAHAM, F. L. 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*, 16, 869-871.
- SHIELLS, R. & FALK, G. 1992. Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. *Neuroreport*, 3, 845-848.
- SHIGA, T. & SUZUKI, N. 2005. Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase. *Zoolog Sci*, 22, 735-742.
- SHIMIZU, Y., INOUE, A., TOMARI, Y., SUZUKI, T., YOKOGAWA, T., NISHIKAWA, K. & UEDA, T. 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*, 19, 751-755.
- SHIMIZU, Y., KANAMORI, T. & UEDA, T. 2005. Protein synthesis by pure translation systems. *Methods*, 36, 299-304.
- SIERVO, M., CAPUANO, L. & COLANTUONI, A. 2010. Physiology and in vivo measurements of nitric oxide in man. *Clin Ter*, 161, 173-183.
- SMOCK, R. G. & GIERASCH, L. M. 2009. Sending signals dynamically. *Science*, 324, 198-203.
- SNYDER, S. H. 2005. The Audacity Principle in Science. *Proc Am Philos Soc*, 149, 141-158.
- SORET, J.-L. 1883. Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 97, 1269-1270.
- STASCH, J.-P., SCHMIDT, P., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., DEMBOWSKY, K., HAERTER, M., HEIL, M., MINUTH, T., PERZBORN, E., PLEISS, U., SCHRAMM, M., SCHROEDER, W., SCHRÖDER, H., STAHL, E., STEINKE, W. & WUNDER, F. 2002. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol*, 136, 773-783.
- STASCH, J. P., BECKER, E. M., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., DEMBOWSKY, K., FEURER, A., GERZER, R., MINUTH, T., PERZBORN, E., PLEISS, U., SCHRODER, H., SCHROEDER, W., STAHL, E., STEINKE, W., STRAUB, A. & SCHRAMM, M. 2001. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, 410, 212-215.
- STASCH, J. P. & HOBBS, A. J. 2009. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*. 191 ed. Heidelberg: Springer.
- STASCH, J. P., SCHMIDT, P. M., NEDVETSKY, P. I., NEDVETSKAYA, T. Y., H, S. A., MEURER, S., DEILE, M., TAYE, A., KNORR, A., LAPP, H., MULLER, H., TURGAY, Y., ROTHKEGEL, C., TERSTEEGEN, A., KEMP-HARPER, B., MULLER-ESTERL, W. & SCHMIDT, H. H. 2006. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*, 116, 2552-2561.
- STEINER, R. 1994. Advanced Technology Guide - LS 6500 Scintillation Systems. *Handbuch des Herstellers Beckmann-Coulter*.

-
- STEPHENSON, R. P. 1956. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother*, 11, 379-393.
- STONE, J. R. & MARLETTA, M. A. 1994. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 33, 5636-5640.
- STUDENT 1908. THE PROBABLE ERROR OF A MEAN. *Biometrika*, 6, 1-25.
- STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189, 113-130.
- STUMMER, W., PICHLMEIER, U., MEINEL, T., WIESTLER, O. D., ZANELLA, F. & REULEN, H.-J. 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7, 392-401.
- TAMARGO, J. & LÓPEZ-SENDÓN, J. 2011. Novel therapeutic targets for the treatment of heart failure. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 536-555.
- TERPE, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 523-533.
- TERRY, C. J., POPPLEWELL, J. F., SWANN, M. J., FREEMAN, N. J. & FERNIG, D. G. 2006. Characterisation of membrane mimetics on a dual polarisation interferometer. *Biosens Bioelectron*, 22, 627-632.
- THEWS, G., MUTSCHLER, E. & VAUPEL, P. 1999. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- THOMAS, G. R., DIFABIO, J. M., GORI, T. & PARKER, J. D. 2007. Once daily therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism. *J Am Coll Cardiol*, 49, 1289-1295.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res*, 25, 4876-4882.
- THULASIRAMAN, V. & MATTS, R. L. 1996. Effect of geldanamycin on the kinetics of chaperone-mediated renaturation of firefly luciferase in rabbit reticulocyte lysate. *Biochemistry*, 35, 13443-13450.
- THURING, R. W., SANDERS, J. P. & BORST, P. 1975. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal Biochem*, 66, 213-220.
- TIKOLE, S. & SANKARARAMAKRISHNAN, R. 2008. Prediction of translation initiation sites in human mRNA sequences with AUG start codon in weak Kozak context: A neural network approach. *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 1166-1168.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4354.
- TRUONG, K. & IKURA, M. 2001. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 573-578.
- TSIEN, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-544.
- TUKEY, J. W. 1977. *Exploratory data analysis*, Boston, MA, USA, Addison-Wesley Pub. Co.

Quellenverzeichnis

-
- VALPUESTA, J. M., MARTIN-BENITO, J., GÓMEZ-PUERTAS, P., CARRASCOSA, J. L. & WILLISON, K. R. 2002. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Letters*, 529, 11-16.
- VAUGHN, J. L., GOODWIN, R. H., TOMPKINS, G. J. & MCCAWLEY, P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13, 213-217.
- VEITH, D. & VEITH, M. 2005. Biologie fluoreszierender Proteine: Ein Regenbogen aus dem Ozean. *Biol Unserer Zeit*, 35, 394-404.
- VENEMA, R. C., VENEMA, V. J., JU, H., HARRIS, M. B., SNEAD, C., JILLING, T., DIMITROPOULOU, C., MARAGOUidakis, M. E. & CATRAVAS, J. D. 2003. Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, 669-678.
- VIGNAL-CLERMONT, C., AUDO, I., SAHEL, J.-A. & PAQUES, M. 2010. Poppers-Associated Retinal Toxicity. *N Engl J Med*, 363, 1583-1585.
- WAGNER, C., RUSSWURM, M., JAGER, R., FRIEBE, A. & KOESLING, D. 2005. Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *J Biol Chem*, 280, 17687-17693.
- WANG, E. T., SANDBERG, R., LUO, S., KHREBTUKOVA, I., ZHANG, L., MAYR, C., KINGSMORE, S. F., SCHROTH, G. P. & BURGE, C. B. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456, 470-476.
- WANG, P. G., CAI, T. B. & TANIGUCHI, N. 2005. *Nitric oxide donors: for pharmaceutical and biological applications*, Weinheim, Wiley-VCH.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem Z*, 310, 384-421.
- WEDEL, B., HUMBERT, P., HARTENECK, C., FOERSTER, J., MALKIEWITZ, J., BOHME, E., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1994. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2592-2596.
- WELLS, C. A., DINGUS, J. & HILDEBRANDT, J. D. 2006. Role of the chaperonin CCT/TRiC complex in G protein betagamma-dimer assembly. *J Biol Chem*, 281, 20221-20232.
- WENZL, M. V., BERETTA, M., GRIESBERGER, M., RUSSWURM, M., KOESLING, D., SCHMIDT, K., MAYER, B. & GORREN, A. C. 2011. Site-Directed Mutagenesis of Aldehyde Dehydrogenase-2 Suggests Three Distinct Pathways of Nitroglycerin Biotransformation. *Mol Pharmacol*, 80, 258-266.
- WHITE, A. A. 1974. Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. *Methods Enzymol*, 38, 41-46.
- WHITE, A. A. & AURBACH, G. D. 1969. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, 191, 686-697.
- WHO 2009. The use of stems in the selection of International Nonproprietary Names (INN) for pharmaceutical substances. Genf, CH.
- WINGER, J. A. & MARLETTA, M. A. 2005. Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry*, 44, 4083-4090.

-
- WOOD, J. & GARTHWAITE, J. 1994. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*, 33, 1235-1244.
- XIA, T., DIMITROPOULOU, C., ZENG, J., ANTONOVA, G. N., SNEAD, C., VENEMA, R. C., FULTON, D., QIAN, S., PATTERSON, C., PAPAPETROPOULOS, A. & CATRAVAS, J. D. 2007. Chaperone-dependent E3 ligase CHIP ubiquitinates and mediates proteasomal degradation of soluble guanylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, 3080-3087.
- YUEN, P. S., DOOLITTLE, L. K. & GARBERS, D. L. 1994. Dominant negative mutants of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *J Biol Chem*, 269, 791-793.
- YUEN, P. S., POTTER, L. R. & GARBERS, D. L. 1990. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*, 29, 10872-10878.
- YUSTE, R. 2005. Fluorescence microscopy today. *Nat Meth*, 2, 902-904.
- ZABEL, U., HAUSLER, C., WEEGER, M. & SCHMIDT, H. H. 1999. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem*, 274, 18149-18152.
- ZABEL, U., WEEGER, M., LA, M. & SCHMIDT, H. H. 1998. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J*, 335 (Pt 1), 51-57.
- ZEBOL, J. R., HEWITT, N. M., MORETTI, P. A., LYNN, H. E., LAKE, J. A., LI, P., VADAS, M. A., WATTENBERG, B. W. & PITSON, S. M. 2009. The CCT/TRiC chaperonin is required for maturation of sphingosine kinase 1. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 822-827.
- ZENG, J., ALHAJJ, R. & DEMETRICK, D. J. 2009. Representative transcript sets for evaluating a translational initiation sites predictor. *BMC Bioinformatics*, 10, 206.
- ZHAO, Y., BRANDISH, P. E., DIVALENTIN, M., SCHELVIS, J. P., BABCOCK, G. T. & MARLETTA, M. A. 2000. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODC. *Biochemistry*, 39, 10848-10854.
- ZHAO, Y., SCHELVIS, J. P., BABCOCK, G. T. & MARLETTA, M. A. 1998. Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry*, 37, 4502-4509.
- ZHOU, Z., GROSS, S., ROUSSOS, C., MEURER, S., MÜLLER-ESTERL, W. & PAPAPETROPOULOS, A. 2004. Structural and Functional Characterization of the Dimerization Region of Soluble Guanylyl Cyclase. *J Biol Chem*, 279, 24935-24943.
- ZORN, J. A. & WELLS, J. A. 2010. Turning enzymes ON with small molecules. *Nat Chem Biol*, 6, 179-188.
-

- Bibelzitat auf S. V

Die Bibel nach der Übersetzung MARTIN LUTHER in der revidierten Fassung von 1984. 1984 Deutsche Bibelgesellschaft, Stuttgart.

- Bild „Häm“

„Haem“. Die Nutzung des Bildes beruht auf der freundlichen Genehmigung von Professor Dr. rer. nat. Dr. h. c. HERMANN JOSEF ROTH (19.09.2010 per E-Mail).

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	GC-vermittelte Konversion von GTP zu cGMP	3
Abbildung 2	cGMP-bildenden Enzyme	4
Abbildung 3	DEA/NO	8
Abbildung 4	Struktur von Lificiguat und Riociguat	11
Abbildung 5	Struktur- und Struktur-Wirkungs-Beziehung von Cinaciguat	13
Abbildung 6	Struktur von ODC	14
Abbildung 7	Lokalisation der NOsGC im Gefäßsystem	16
Abbildung 8	Modell der katalytischen Domäne der NOsGC	19
Abbildung 9	Domänenorganisation der NOsGC	19
Abbildung 10	Hämbindetasche	20
Abbildung 11	Gegenüberstellung <i>Wagner et al.</i> und <i>Koglin und Behrends</i>	21
Abbildung 12	Vektorkarte von pFastBac™ Dual	49
Abbildung 13	Vektorkarte von pET™ Duet-1	53
Abbildung 14	Prinzip der Mutagenese	55
Abbildung 15	Sequenzierchromatogramm: α_1 WTD529A	56
Abbildung 16	Sequenzierchromatogramm: $\alpha_1\Delta$ N259D529A	56
Abbildung 17	Sequenzierchromatogramm: β_1 H105A	57
Abbildung 18	Prinzip des Bac-to-Bac® Expressionssystems	59
Abbildung 19	Pipettierschema für Virustiterbestimmung	62
Abbildung 20	Prinzip des pET Expressionssystems	66
Abbildung 21	Prinzip der Immunpräzipitation	69
Abbildung 22	Prinzip der <i>Strep</i> Tag II Affinitätschromatographie	70
Abbildung 23	Struktur von Coomassie-Brillant-Blau G-250	73
Abbildung 24	Prinzip der Western-Blot-Analyse	74
Abbildung 25	Standardgerade der Gelfiltration	78
Abbildung 26	Charakterisierung der α_1 -Untereinheiten	88
Abbildung 27	Schematische Darstellung der Stärke der Startcodons	89
Abbildung 28	Densitometrische Untersuchung der Anreinigung	91
Abbildung 29	Gegenüberstellung: Coomassie- und Silberfärbung	91
Abbildung 30	Gelfiltration der NOsGC	93
Abbildung 31	Visualisierung des C- α_1 -Proteins	94
Abbildung 32	Coomassie-Gel: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	94
Abbildung 33	Western-Blot-Analyse: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	95
Abbildung 34	Densitometrie: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	96
Abbildung 35	UV/Vis-Spektroskopie: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	97
Abbildung 36	Assay: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	98
Abbildung 37	C- α_1 : Versuch zum Hämin- und LMS-Zusatz	99
Abbildung 38	FLIM-FRET: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	100
Abbildung 39	Subzelluläre Lokalisation: α_1 WT/ β_1 -S und C- α_1 / β_1 -S	102
Abbildung 40	Anregungsspektrum von Grx1-roGFP2	104
Abbildung 41	Visualisierung der $\alpha_1\Delta$ N ₃₆₄ -Isoform	106
Abbildung 42	Untersuchungen zur $\alpha_1\Delta$ N ₃₆₄ -Isoform	107
Abbildung 43	Visualisierung der $\alpha_1/\beta_1\Delta$ N _{H-NOX} -Isoform	108
Abbildung 44	Untersuchungen zur $\alpha_1/\beta_1\Delta$ N _{H-NOX} -Isoform	109
Abbildung 45	Experimenteller Aufbau: Austauscherversuch	110
Abbildung 46	Western-Blot-Analyse: Expression in <i>E. coli</i>	112
Abbildung 47	Western-Blot-Analyse: Expression in EasyXpress®	113

Abbildung 48	Kontrolle der enzymatischen Aktivität der Luciferase	115
Abbildung 49	Untersuchungen: Expression in PURExpress®	115
Abbildung 50	Western-Blot-Analyse: HSP70 / HSP90	118
Abbildung 51	Untersuchungen zur Interaktion: β_1 -Untereinheit mit CCT η	119
Abbildung 52	Anreinigung von CCT η	120
Abbildung 53	Wirkung der Membran-Mimetika	134

10. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius; häufig gebrauchte Temperatureinheit, wenngleich Kelvin die SI-Einheit darstellt $\{T[K] = T[°C] + 273,15\}$
μ	Mikro; SI-Präfix für Millionstel $[10^{-6}]$
^{32}P	Phosphorisotop-32
3-MPST	<u>3</u> - <u>M</u> ercap <u>t</u> opyruvats <u>u</u> lfur <u>t</u> ransferase
a	Jahr; (lat. <u>a</u> nnus)
A	Ampere
Å	Ångström; Längeneinheit; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AK	<u>A</u> ntik <u>k</u> örper
ANP	<u>A</u> triales <u>N</u> atriuretisches <u>P</u> eptid
AS	<u>A</u> mino <u>s</u> äure(n)
BAY 41-2272	5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluorbenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazol[3,4- <i>b</i>]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamin
Bluo-gal	5-Brom-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
bp	Nukleotid- <u>B</u> asen <u>p</u> aar
Bq	Becquerel SI-Einheit für die Aktivität einer radioaktiven Substanz; entspricht dem radioaktiven Zerfall pro Sekunde ($1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$)
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti; SI-Präfix für Hundertstel $[10^{-2}]$
<i>c</i>	Konzentrationsangabe $[m/V]$
ca.	ungefähr oder etwa; (lat. <u>c</u> ir <u>c</u> a)
cAMP	<u>c</u> yclisches <u>A</u> denosin-3',5'- <u>m</u> onophosphat
CBS	<u>C</u> ystathionin-β- <u>s</u> ynthase

CCD	auf einer Halbleitertechnik basierende Photosensoren (engl. <i>charge coupled devices</i>)
cDNA	Mittels reverser Transkriptase gewonnene DNA aus mRNA, die ein Peptid oder Protein codiert (engl. <i>complementary DNA</i>).
cfu	Koloniebildende Einheit (engl. <i>colony forming unit</i>)
(E)CFP	[<i>enhanced</i> (verbessertes)] <i>Cyan Fluoreszierendes Protein</i>
cGK	<i>c</i> GMP-abhängige Protei <u>n</u> kinase
CGL	<i>C</i> ystathionin-γ-lyase
cGMP	cyclisches <i>G</i> uanosin-3',5'- <i>m</i> onophosphat
Ci	Curie seit 1986 durch Bq (SI) ersetzte Einheit für die Aktivität einer radioaktiven Substanz; wird aber beim Umgang mit Radionukliden immer noch häufig verwendet $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$
CO	<i>K</i> ohlenstoffmonox <u>i</u> d
cpm	Zählereignisse pro Minute (engl. <i>counts per minute</i>)
d.h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt
Da	Dalton In der Biochemie übliches Synonym für die atomare Masseneinheit u (engl. <i>unified atomic mass</i>), welche seit 1961 definitionsgemäß $1/12$ der Masse eines isolierten Atoms des Kohlenstoff-Isotops ^{12}C im Grundzustand entspricht. $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} \approx 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
DEA/NO	<i>D</i> iethylentriam <u>i</u> n/ <i>S</i> tickstoff <u>m</u> onox <u>i</u> d Addukt [Diethylammonium(Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolat]
DKFZ	<i>D</i> eutsches <i>K</i> rebs <u>f</u> orschungs <u>z</u> entrum
DMEM	<i>D</i> ulbecco's <i>M</i> odified <i>E</i> agle <i>M</i> edium
DMSO	<i>D</i> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xid
DNA	<i>D</i> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
dNTP	<i>D</i> esoxyribo <u>n</u> ukleosid-5'-triphosphat(e)
dto.	ebenso (lat. <i>dito</i>)

Abkürzungsverzeichnis

DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l
<i>E. coli</i>	<u>E</u> sch <u>e</u> richia <u>c</u> oli
EC ₅₀	halbmaximale <u>E</u> ffektork <u>o</u> nzentration
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDRF	Endothelialer Relaxierender Faktor (engl. <u>e</u> ndothelium <u>d</u> erived <u>r</u> elaxing <u>f</u> actor)
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> mintetra <u>e</u> ssigsäure
(E)GFP	[<u>e</u> nhanced (verbessertes)] <u>G</u> rün <u>F</u> luoreszierendes <u>P</u> rotein
EMA	<u>E</u> uropean <u>M</u> edicines <u>A</u> gency
et al.	und andere (lat. <u>e</u> t <u>a</u> lii)
eV	<u>E</u> lektron <u>v</u> olt
Fa.	Firma
FBS	<u>F</u> etales <u>B</u> ovines <u>S</u> erum
FLIM	mikroskopisches Verfahren zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit von Fluorophoren (engl. <u>f</u> luorescence <u>l</u> ifetime <u>i</u> maging <u>m</u> icroscopy)
FRET	<u>F</u> luoreszenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergiet <u>r</u> ansfer
<i>g</i>	mittlere Schwerebeschleunigung $1\ g = 9,81\ \text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
g	Gramm
GI	<u>G</u> astrointestinaltrakt
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (engl. <u>G</u> <u>p</u> rotein- <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptor)
GTP	<u>G</u> uanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HA	<u>H</u> ämaglutinin Tag Ein häufig benutztes Dekapeptid zur Markierung von Proteinen, da es stark immunreaktiv ist. Es entspricht einem Teil des Glycoproteins von Influenza A Viren.
HABA	2-(4- <u>H</u> ydroxyphenyl <u>a</u> zo)- <u>b</u> enzo <u>e</u> säure
HBSS	<u>H</u> anks' <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HO	Hämoxygenase
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunohistochemie
INN	Internationaler Freiname (engl. <i>International Nonproprietary Name</i>) für Arzneistoffe, welcher von der WHO vergeben wird.
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo; SI-Präfix für Tausend [10^3]
kb	Kilobasenpaare (1.000 bp)
kg	Kilogramm; SI-Basiseinheit der Masse
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
l	Liter
Laser	Lichtverstärkung durch induzierte Emission von Strahlung (engl. <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>) [Übersetzung nach Langenscheidt Online-Wörterbücher, 2011]
LB	das meistverwendete Medium, für die Kultur von <i>E. coli</i> ; ursprünglich von Bertani 1951 beschrieben (BERTANI, 1951); (engl. <i>lysogeny broth</i>)
LMS	Lipid Medium Supplement
<i>m</i>	Masse
M	Mega; SI-Präfix für Million [10^6]
m	Meter; SI-Basiseinheit für die Länge
m	Milli; SI-Präfix für Tausendstel [10^{-3}]
<i>M</i>	molar [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
MCS	Bereich eines Vektors der sich durch eine Vielzahl an unikalenen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen auszeichnet (engl. <i>multiple cloning site</i>).
Me	Metallion

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
mol	Mol; SI-Basiseinheit der Stoffmenge; $1 \text{ mol} = 6,02214 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
n	Nano; SI-Präfix für Milliardstel [10^{-9}]
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	Abkürzung für die Firma <u>N</u> ew <u>E</u> ngland <u>B</u> iolabs mit Sitz in Frankfurt am Main
NO	<u>S</u> tickstoffmon <u>o</u> xid / <u>N</u> itrogeniummon <u>o</u> xid oder <i>nitric oxide</i>
NOS	<u>N</u> O-Synthase
N _{Ox}	<u>O</u> xidations <u>z</u> ahl
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4] <u>o</u> xadiazol[4,3- <i>a</i>]chinoxalin-1-on (im Englischen: <u>Q</u> uinoxaline)
ORF	offenes Leseraster (engl. <i>open reading frame</i>) „Eine zwischen einem Start- und einem Stop[p]-Codon liegende fortlaufende längere Reihe von Nukleotid-Tripletts, die in eine Polypeptid-Kette übersetzt werden kann.“ (Thieme RÖMPP Online; 13.03.2011)
OZ	Ordnungszahl
p.n.	nach der Geburt (lat. <i>post natum</i>)
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> ele <u>e</u> lektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank; pdb.org; Datenbank für Strukturinformationen über Proteine
PDE	<u>P</u> hosphodi <u>e</u> sterase
PDI	<u>P</u> rotein <u>D</u> isulfid <u>I</u> somerase

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPIX	<u>P</u> rotoporphyrin <u>I</u> X
ppm	Teile pro Million (engl. <i>parts per million</i>)
resp.	respektive
RNA	<u>R</u> ibonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RT-PCR	Echtzeit (engl. <i>real time</i>) <u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> olymerase- <u>K</u> etten <u>r</u> eaktion
s	Sekunde, SI-Basiseinheit der Zeit
S	<i>Strep</i> Tag II
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>m</u> ethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of means</i>)
<i>Sf</i>	<i><u>S</u>podoptera <u>f</u>rugiperda</i>
SI	Internationale Einheitensystem (franz. <i>Système international d'unités</i>)
SOB	Nährmedium für <i>E. coli</i> ; <i>super optimal broth</i>
SOC	um Glucose ergänztes SOB-Medium; c für <i>catabolite repression</i>
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate gepufferte Lösung mit <u>E</u> DTA
TBST	TRIS-gepufferter Salzlösung mit Tween (engl. <i>TRIS-buffered saline-tween</i>)
TCID ₅₀	Viruskonzentration, die 50 % der Zellkultur infiziert
TE	<u>T</u> ransformationseffizienz
TEA	<u>T</u> riethanol <u>a</u> min
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min

Abkürzungsverzeichnis

TRIS	<u>Tris</u> (hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat Sorbitanfettsäureester [Dodecansäure (Laurinsäure); gesättigte C12-Fettsäure] mit Polyethylenglycol
<i>U</i>	engl. <i>enzyme unit</i> , in der Biochemie noch heute weitverbreitete Angabe einer Enzymaktivität; die SI-Einheit (seit 1972) zur Beschreibung dessen ist <i>katal</i> (Abk. <i>kat</i>) 1 <i>U</i> = Enzymmenge, die pro min ein μmol Substrat umsetzt
u.a.	unter anderem
ugs.	<u>u</u> mgangssprachlich
UV	ultraviolett
V	Volt
<i>V</i>	Volumen
vgl.	vergleiche
Vis	<u>vis</u> uelles Spektrum (etwa 380 – 780 nm)
WB	<u>W</u> estern <u>b</u> lot
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization)
WT	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
XFP	Fluoreszenzprotein (allgemein)
(E)YFP	[<u>e</u> nhanced (verbessertes)] Gelb Fluoreszierendes Protein (<u>y</u> ellow <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ϵ_{rel}	relativer Extinktionskoeffizient
λ_{max}	Absorptionsmaximum im UV/Vis-Spektrum

Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin
R	Arg	Arginin	H	His	Histidin	S	Ser	Serin
N	Asn	Asparagin	I	Ile	Isoleucin	T	Thr	Threonin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	W	Trp	Tryptophan
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
Q	Gln	Glutamin	F	Phe	Phenylalanin			

Der Einbuchstabencode der Aminosäuren entspricht der Nomenklatur Komitee der internationalen Unionen der Biochemie von 1984 (IUPAC-IUB, 1984).

Publikationsverzeichnis

Ein stetig aktualisiertes Publikationsverzeichnis findet sich unter der Researcher-ID: D-5327-2009.

Publikationen

Kraehling, J. R., Busker, M., Haase, T., Haase, N., Koglin, M., Linnenbaum, M., and Behrends, S. The amino-terminus of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase α_1 does not affect dimerization but influences subcellular localization. *PLoS ONE*, 2011. 6(9): e25772.

Haase, N., Haase, T., **Kraehling, J. R.**, and Behrends, S., Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive Guanylyl-Cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol*, 2010. 80, p. 1676-1683.

Haase, T., Haase, N., **Kraehling, J. R.**, and Behrends, S., Fluorescent Fusion Proteins of Soluble Guanylyl Cyclase Indicate Proximity of the Heme Nitric Oxide Domain and Catalytic Domain. *PLoS ONE*, 2010. 5(7): p. e11617.

Tagungsbeiträge

Kraehling, J. R., Busker, M., Haase, T., Seeanner, M., and Behrends, S., Dimerization of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2010. 107(s1): p. 162-692.

Kraehling, J. R., Busker, M., Haase, N., Haase, T., Linnenbaum, M., Oberle, S., and Behrends, S., Analysis of requirements for dimerization of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG)*, 2010.

Busker, M., **Kraehling, J. R.**, Seeanner, M., and Behrends S., Analysis of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activation by ciguates based on MANT-GTP fluorescence. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2010. 107(s1): p. 162-692.

Seeanner, M., **Kraehling, J. R.**, Busker, M., and Behrends, S., Distinct NADPH-cytochrome P450 reductase dependence of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2010. 107(s1): p. 162-692.

Busker, M., Haase, N., Haase, T., **Kraehling, J. R.**, Linnenbaum, M., Oberle, S., and Behrends, S., Förster resonance energy transfer between 2'-MANT-3'dGTP and nitric oxide sensitive guanylyl cyclase. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG)*, 2010.

Linnenbaum, M., Busker, M., Haase, N., Haase, T., **Kraehling, J. R.**, Oberle, S., and Behrends, S., Nuclear translocation of heme oxygenase under cellular stress conditions is isoform specific. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG)*, 2010.

Behrends, S., Busker, M., Haase, N., Haase, T., **Kraehling, J. R.**, and Linnenbaum, M., Conjoined NO-sensitive guanylyl cyclases. *BMC Pharmacology*, 2011. 11, P6.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. med. Sönke Behrends für die ausgezeichnete Betreuung dieser Dissertation. Er nahm sich stets die Zeit kleinere und größere Probleme zu besprechen und somit den Fortgang der Arbeit zu sichern. Durch seine Art des wissenschaftlichen Mentorings in der Form zahlreicher Diskurse habe ich sehr viel gelernt, auch weit über das Thema dieser Arbeit hinaus. Er hat mir immer wieder neue Denkanstöße gegeben und war zu jeder Zeit offen für eine Diskussion auf Augenhöhe.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Conrad Kunick.

Für die exzellente technische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und für die große Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Andreas Arnold, Gerlind Henze-Wittenberg, Carolin Rattunde, Anja Stieler, Ines Thomsen und Jana Zenk herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Susanne Hornig, welche mir in vielen organisatorischen Dingen hilfreich zur Seite stand.

Ich danke meinen Kollegen Joana Bartels, Michael Belz, Ulrich Beyer, Mareike Busker, Sylvia Deppe, Hany Ghaly, Nadine Haase, Tobias Haase, Katharina Henkenius, Kathrin Hatlapatka, Monika Linnenbaum, Lutz Löbermann, Stefanie Oberle-Plümpe, Anne Ripperger, Michael Willenborg und Friederike Würch für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für eine Promotionszeit in Braunschweig, an die ich mich gerne zurückerinnern werde.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern, Ursula und Peter, und meiner Großmutter, Margarethe Thora, welche durch Ihre Erziehung sowie fortwährende und umstandslose Unterstützung das Studium der Pharmazie und damit auch diese Arbeit erst ermöglicht haben.